Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor Professor Dr. H.D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

DIE VERWENDUNG KOMPLETTER FLUOROCHROMIERTER ANTIKÖRPER ZUR CHARAKTERISIERUNG LYMPHOIDER ZELLINIEN UND IHRER BEZIEHUNG ZUM EPSTEIN-BARR VIRUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Herbert Stuckstedte
aus Essen
1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548928_0008

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor Professor Dr. H.D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

DIE VERWENDUNG KOMPLETTER FLUOROCHROMIERTER ANTIKÖRPER ZUR CHARAKTERISIERUNG LYMPHOIDER ZELLINIEN UND IHRER BEZIEHUNG ZUM EPSTEIN-BARR VIRUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Herbert Stuckstedte
aus Essen
1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan : Professor Dr. Dr. N. Schwenzer

Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. W. v. Heyden
(Professor Dr. H. D. Waller)

Meinen Eltern

Herrn Professor Dr. H.D. WALLER danke ich für die Möglichkeit, innerhalb seiner Abteilung eine experimentelle Arbeit durchzuführen.

Ganz besonderen Dank schulde ich Herrn Privatdozent Dr. H.W. v. HEYDEN, unter dessen Anleitung die vorliegende Arbeit zustande kam, und der mir bei Abfassung und Korrektur des Manuskriptes in beispielhafter Weise behilflich war.

Nicht zuletzt möchte ich allen Mitarbeiterinnen- und Mitarbeitern des eigenen- und der benachbarten Laboratorien für eine konstruktive Zusammenarbeit danken, insbesondere Frau U. MUTSCHLER ✝ und Frau J. PEUKER.

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1 - 6
I.1.	Epstein-Barr Virus (EBV) und die Etablierung lymphoider Zellinien (LZL) ..	1
I.2.	EBV-Assoziierte Antigene	2
I.3.	EBV und die infektiöse Mononukleose ..	2 - 4
I.4.	EBV und neoplastische Erkrankungen ...	4 - 5
II	METHODIK	7 - 17
II.1.	Isolierung und Anreicherung von Leukozyten aus venösem Blut	7 - 8
II.2.	Etablierung und Haltung lymphoider Zellinien	8 - 9
II.3	Bildung von E-Rosetten	9 - 10
II.4.	Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen mit kompletten Fluoreszein-markierten Antikörpern	10 - 12
II.4.1.	Direkter Immunfluoreszenztest	12
II.4.2.	Indirekter Immunfluoreszenztest	12 - 13
II.4.3.	Kappenphänomen von Oberflächenimmunglobulinen	13
II.5.	Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen mit Hilfe von I^{125}-markierten $(Fab')_2$-Anti-Ig-Antikörpern	13 - 14
II.6.	Nachweis intrazytoplasmatischer EBV-spezifischer Antigene	14 - 16
II.7.	Etablierung lymphoider Zellinien aus Nabelschnurleukozyten durch Infektion mit EBV-Partikeln	16
II.8.	Wachstum lymphoider Zellinien in Diffusionskammern nach BENESTAD	16 - 17
III	ERGEBNISSE	18 - 48
III.1.	Herkunft und Charakteristika von Zellinien	18 - 20

III.2.	Etablierung und Wachstum lymphoider Zellinien	20 - 21
III.3.	Verhalten lymphoider Zellinien in Diffusionskammern nach Implantation in bestrahlte- und unbestrahlte Mäuse ...	22 - 23
III.4.	Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen bei mononukleären Zellen mittels direkter- und indirekter Immunfluoreszenztechnik	23 - 31
III.5.	Vergleich Immunfluoreszenztest-Radioautographie bei dem Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen	32 - 33
III.6.	Expression von Oberflächenimmunglobulinen während der Etablierung und Kultivierung von Zellinien	33 - 35
III.7.	Expression von Oberflächenimmunglobulinen bei frisch isolierten mononukleären Zellen von Patienten	36
III.8.	Bildung von Spontanrosetten mit Schaferythrozyten bei Zellinien und bei frisch isolierten mononukleären Zellen von Patienten	36
III.9.	Nachweis des Early Antigen / Viral-Capsid-Antigenkomplexes (EA/VCA) ...	39 - 48
IV	DISKUSSION	49 - 55
IV.1.	Lymphoide Zellinien und die Existenz von Vorläuferzellen	49 - 51
IV.2.	Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen auf lymphoiden Zellinien	51 - 53
IV.3.	Nachweis des EA/VCA Antigenkomplexes und die Bestimmung der EBV-Antikörpertiterhöhe in Seren	53 - 55
V	ZUSAMMENFASSUNG	56 - 57
VI	LITERATUR	58 - 73

A B K Ü R Z U N G E N

AK	=	Antikörper
B	=	Bodensatz
BL	=	Burkitt Lymphom
DNS	=	Desoxyribonukleinsäure
EA	=	Early Antigen
EBV	=	Epstein Barr Virus
EBNA	=	Epstein Barr Virus determined nuclear antigen
FITC	=	Fluorescein-Isothiocyanat
IE	=	Internationale Einheiten
Ig	=	Immunglobulin
IFZT	=	Immunfluoreszenztest
IM	=	infektiöse Mononukleose
LBZL	=	lymphoblastoide Zellinien
LZL	=	lymphoide Zellinien
MA	=	Membrane Antigen
NPC	=	Nasopharyngeal Carcinom
PBS	=	phosphate buffered saline
TZL	=	Tumorzellinien
Ü	=	Überstand
VCA	=	Viral capsid antigen
ZL	=	Zellinie

I. EINLEITUNG

I. 1. Epstein-Barr-Virus (EBV) und die Etablierung lymphoider Zellinien (LZL)

Lymphoide Zellinien werden seit mehr als zwanzig Jahren gezüchtet (77). Als Ausgangsmaterial dienen Leukozyten aus Blut, Knochenmark oder lymphatischen Geweben von Gesunden oder Patienten.

Werden Leukozyten zur Kultur angesetzt, so kennzeichnet die rapide Zunahme der Zellzahl nach einer mehrwöchigen Latenzphase (lag-Phase) die Etablierung einer Zellinie (ZL) (68).

Mit Hilfe von Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Hybridisierungsversuchen wurden in LZL Genomäquivalente eines Virus der Herpesgruppe, des EBV, gefunden (28, 76).

Das Vorhandensein eines EBV-Rezeptors auf B-Lymphozyten (26, 51), sowie die B-Zell Charakteristik der meisten getesteten LZL legte die Vermutung nahe, daß nur Zellen vom B-Typ für eine Infektion mit EBV empfänglich sind (51, 79).

Das Virus ist in der Lage, B-Zellen zu transformieren, sodaß unter Kulturbedingungen in vitro Zellklone mit nicht limitierter Teilungspotenz entstehen (63). Diese Tatsache liefert die Erklärung dafür, daß die Etablierung von ZL nur aus den lymphoiden Zellen von Spendern mit Antikörpertitern gegen EBV gelang (23, 72, 73, 74). Bei den Leukozyten seronegativer Spender war dies nur nach in vitro Infektion mit zellfreien EBV-Partikeln möglich (73, 74).

I. 2. EBV - Assoziierte Antigene

Die Interaktion von Virus und Wirtszelle führt zur Ausprägung EBV - Assoziierter Antigene, die unter anderem mit Hilfe entsprechender Antiseren immunfluoreszenztechnisch nachgewiesen werden können (30).
EBV tragende Zellinien werden je nach Expression EBV-spezifischer Antigene in Virus produzierende und nicht Virus produzierende Linien unterteilt (54).
Membran Antigen (MA) (52), Early Antigen (EA) (34) und Viral Capsid Antigen (VCA) (30) ließen sich nur bei Virus produzierenden, nicht jedoch bei nicht produzierenden LZL nachweisen (85).
Bei fast allen Linien fand man das Nukleäre Antigen (EBNA) (85) und ein lösliches, Komplement fixierendes Antigen (95). Während 95 % der EBV Genom tragenden, proliferierenden Zellen EBNA aufweisen (85), konnte der EA/VCA-Komplex bei nur 1 - 10 % der Zellen einer Virus produzierenden Population gefunden werden (30, 85). Das Auftreten von EA signalisiert die beginnende Synthese virusspezifischer DNS (58). Zusammen mit der Expression von VCA kennzeichnet es den Eintritt der Wirtszelle in einen lytischen, oftmals auch abortiv verlaufenden viralen Synthesezyklus, bei dem die Produktion wirtseigener DNS supprimiert ist (25).

I. 3. EBV und die Infektiöse Mononukleose (IM)

Antikörpertiter gegen EBV finden sich bei 90 % aller Er-

wachsenen (71, 89). Eine kongenitale Virusinfektion muß in Frage gestellt werden (38, 55, 57). Die im Neugeborenenserum gefundenen Antikörper (AK) gegen EBV sind passiv von der Mutter übertragen und fallen im Laufe der ersten Lebensmonate ab (31).

Ein Titeranstieg mit Serokonversion und lebenslange Immunität gegen IM weisen auf eine stattgefundene Infektion mit EBV hin, wobei der Zeitpunkt der Erstinfektion vom Lebensstandard der betreffenden Bevölkerungsgruppe insofern abhängt, als Angehörige sozial tieferstehender Kreise wesentlich früher und in einem höheren Prozentsatz infiziert werden (38, 55).

In der frühen Kindheit verläuft die Infektion meist klinisch inapparent, bei älteren Jugendlichen entsteht in der Regel das Bild der IM mit Fieber, Lymphknotenschwellungen und Angina tonsillaris (83). Aus dem Rachenspülwasser von Patienten mit dieser Erkrankung konnten, auch Jahre nach der akuten Infektion, infektiöse EBV-Partikel isoliert werden (14).

Das akute Krankheitsstadium ist neben dem Auftreten charakteristischer heterophiler AK (PAUL-BUNELL) durch einen steilen Anstieg EBV-spezifischer Antikörper, vornehmlich Immunglobulinen (Ig) der Klasse IgM, gekennzeichnet (90). Antikörper gegen die EBV-Antigene VCA, MA und EBNA überdauern die akute Phase und persistieren jahrelang (58, 59). Der bei 75 % der Patienten gefundene Anti-EA Titer fällt früher ab und korreliert mit der Schwere des Krankheitsbildes (36, 70).

Die bei der IM auftretenden atypischen Lymphozyten des peripheren Blutes erwiesen sich größtenteils als T-Zellen (62, 80). Man stellt sich vor, daß es sich hierbei um die Reaktion dieser Zellpopulation auf bestimmte, vom Virus konvertierte B- Lymphozyten handelt, deren Proliferation verhindert werden soll (88). Insofern stellt die IM eine sich selbst limitierende B-Zell Erkrankung dar.

I. 4. EBV und neoplastische Erkrankungen

Bei Marmosettaffen (Tamarinus nigricollis) konnte eine direkte onkogene Potenz des EBV nachgewiesen werden (65, 91). Die induzierten Lymphome enthielten EBV-Genom und exprimierten EBNA.

Auch bei verschiedenen lymphoproliferativen Erkrankungen des Menschen wie M. Hodgkin (48) oder der Sarkoidose (45) wurden erhöhte EBV-Antikörpertiter gefunden und deshalb eine virale Genese dieser Erkrankungen diskutiert (55). Signifikante EBV-Antikörpererhöhungen im Vergleich zu Kontrollpopulationen konnten bisher jedoch nur bei zwei Malignomen gesichert werden, dem Burkitt Lymphom (BL) und dem Nasopharyngeal Karzinom (NPC).

BURKITT beschrieb 1958 das endemische Auftreten schnell wachsender lymphoblastoider Tumore an Kopf und Abdominalorganen Jugendlicher in den Malariagebieten Ostafrikas und Neuguineas, wobei er eine infektiöse Genese annahm (11). In 93 % der Tumorbiopsien afrikanischer Patienten mit BL waren EBV-Genomäquivalente nachweisbar, während beim Auf-

treten von Burkitt Tumoren außerhalb Afrikas die Erkrankten in der Regel keine EBV-DNS in ihren Lymphomzellen aufwiesen, obwohl bei diesen Patienten hohe EBV-Antikörpertiter gefunden wurden (78). Trotz identischer Histologie und ähnlicher klinischer Symptomatik wird ein unterschiedlicher Entstehungsmechanismus der beiden Tumore diskutiert. Man unterscheidet deshalb zum besseren Verständnis das afrikanische BL vom Lymphom vom Burkitt Typ (92).
Das NPC ist vorwiegend eine maligne Erkrankung der männlichen Bevölkerung Südostasiens. Der Nachweis von EBV-spezifischer DNS gelang hier nicht in den tumordurchsetzenden lymphatischen Zellen, sondern direkt in den anaplastischen Karzinomzellen (56, 97).
Bei den eingangs genannten Erkrankungen M. Hodgkin und Sarkoidose konnten in den Lymphom- bzw. Granulomzellen keine EBV-spezifische DNS-Äquivalente gefunden werden (60). Die erhöhten EBV-Antikörpertiter bei Trägern dieser Krankheiten werden von einigen Autoren durch eine krankheitsbedingte Störung der zellvermittelten Immunität erklärt (49, 55).

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Etablierung und Haltung lymphoider Zellinien. Bei dem Nachweis der Expression von Oberflächenimmunglobulinen wurde im direkten-und indirekten Immunfluoreszenztest die Verwendung kompletter Antikörper hinsichtlich Spezifität und Aussagekraft an kultivierten lymphoiden Zellinien geprüft.
Weiterhin befaßt sich die Arbeit mit dem Nachweis der Epstein Barr Virus induzierten Antigene EA/VCA bei Zellinien

und der Bestimmung von EA/VCA-Antikörpertitern im Serum von Patienten und Gesunden.

Bei diesen Tests ging es im Hinblick auf die Verwendbarkeit bei der Abklärung unklarer viraler Infektionen darum, einen leicht durchführbaren Test für die Diagnose einer infektiösen Mononukleose zu etablieren.

II. M E T H O D I K

II. 1. Isolierung und Anreicherung von Leukozyten aus venösem Blut

Leukozyten bzw. mononukleäre Zellen wurden aus heparinisiertem Vollblut entsprechend der Methode von BØYUM (9, 10) über einen Dichtegradienten isoliert.

Folgende Trennmedien wurden verwendet:

Urovison^{R}-- Ficoll^{R}:

25 ml Urovison^{R} (SCHERING AG, BERGKAMEN), 11,18 g Ficoll^{R} (MG 400 000; PHARMACIA FINE CHEMICALS, UPPSALA, SWEDEN), und 119,4 ml aqua dest.; Dichte bei 20^{o} C 1,080 g/ml.

Ronpacon^{R}-- Dextran :

20 ml Ronpacon^{R} (CILAG-CHEMIE, ALSBACH), 5,58 g Dextran T 500 (PHARMACIA) und 119 ml aqua dest.; Dichte bei 20^{o} C 1,074 g/ml.

Lymphoprep^{R} :

(NYEGAARD & CO. AS., OSLO, NORWAY), Dichte bei 20^{o} C 1,077 g/ml.

Die im Gemisch verbliebenen Erythrozyten wurden durch Suspension der Zellen in Tris - Ammoniumchloridlösung hämolisiert (9 Teile 0,87 %-ige NH_4Cl-Lösung auf ein Teil 2 M Tris-Puffer (Tris-hydroxy-methyl-amino-methan 60,4 g + 60,4 g 25 %-ige HCl in 1000 ml aqua dest., pH 7,4)). Anschließend wurde mehrfach in Phosphatpuffer (PBS) (0,17 M/l $NaHPO_4$ x 2 H_2O + 0,54 M/l KH_2PO_4 + 0,13 M/l NaCl + 2 % Penicillin, in aqua dest., pH 7,2) gewaschen

und jeweils 10 min. bei 400 g zentrifugiert.

II. 2. Etablierung und Haltung lymphoider Zellinien (LZL)

Entsprechend der Technik nach VON HEYDEN (41) wurden je 2×10^7 steril isolierte mononukleäre Zellen unter Zusatz von 3 ml RPMI 1640 Medium (68), 0,6 ml foetalem Kalbsserum (FKS), das 30 - 60 Minuten bei 56° C Hitze inaktiviert worden war, und 0,2 ml eines Gemisches aus 5000 IE Penicillin + 3000 µg Streptomycin (abs) in verschraubbaren 16 ml Glasröhrchen (BELCO) zur Kultur angesetzt.
Bei Temperaturen von 37° C und einer Luftfeuchtigkeit von 100 % wurden die Kulturen in einem Gemisch aus 90 % filtrierter atmosphärischer Luft und 10 % CO_2 steril gehalten.
Dabei lag der pH der Medien zwischen 6,8 und 7,1.
Nach 24 Stunden wurde ein Teil des zellfreien Überstandes abgegossen und durch frisches Medium ersetzt. Dieser Vorgang wurde bis zur Etablierung zweimal wöchentlich wiederholt.
Etablierte Zellinien wurden in verschlossene Plastikgefäße mit 75, 250 oder 800 ml Fassungsvermögen überführt (FALCON, NUNC).
Der Zusatz von FKS zum Nährmedium wurde auf 10 % reduziert.
RPMI 1640 Medium, FKS und Kulturbehälter wurden von folgenden Firmen bezogen:
abs ASS., BIOMEDICAL SYSTEMS, BUFFALO, N.Y., USA;
FLOW LAB. GmbH, Niederlassung BONN;
GIBCO BIOCULT, GLASGOW, SCOTLAND, GB;

MICROBIOLOGICAL ASS., BETHESDA, MD., USA;
REHATUIN F.S., REHEIS CHEM. COMP., PHOENIX, ARIZ., USA;
BELCO GLASS INC., VINELAND, N.J., USA;
FALCON PLASTICS, OXNARD, CALIF., USA;
NUNC PROD., ROSKILDE, DANMARK.

Für die Überlassung folgender LZL sei sehr herzlich gedankt :
Dr. K.O. FRESEN, Institut für Virologie der Universität Freiburg (Direktor Prof. Dr. H. ZUR HAUSEN) für EBV-negative und konvertierte Zellinien (Ramos, BJAB, P3HRIK). Dr. W. LEIBOLD, Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Direktor Prof. Dr. L.CH. SCHULZ) für die LZL Daudi und B 95-8. Dr. P. WERNET, Medizinische Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin II (Direktor Prof. Dr. H.D. WALLER) für die Linien 1301, 1788, 4098, 6410, 7301, 8866, 3 W-5, NC 37, Raji und Serf.

II. 3. Bildung von E - Rosetten (50, 98)

0,1 ml einer 5 %-igen Suspension 4 x gewaschener Hammelerythrozyten (BEHRINGWERKE MARBURG) in HANKS-Lösung (HBSS, pH 6,5 - 7; FLOW) wurden mit 5 x 10^5 angereicherten mononukleären Zellen in 0,1 ml HANKS-Lösung gemischt. Nach Zusatz von 0,02 ml hitzeinaktivierten AB-Humanserums, das 3 x 15 min. bei 35° C mit Hammelerythrozyten präadsorbiert worden war, inkubierte das Gesamtgemisch 15 min. bei 37° C, wurde anschließend 5 min. bei 200 g zentrifugiert und 12 Stunden bei 4° C gehalten.

Nach vorsichtigem Aufsuspendieren wurden die Zellen in der NEUBAUER-Zählkammer ausgewertet. Lymphozyten mit drei und mehr angelagerten Erythrozyten galten als positive Rosetten.

II. 4. Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen mit kompletten Fluoreszein-markierten Antikörpern

Zellen, die im Trypanblautest (1 %-ige Trypanblaulösung zum Ausschluß toter Zellen) eine Vitalität von über 95 % aufwiesen, wurden dreimal in PBS gewaschen. Dieser dreimalige Waschvorgang schloß sich ebenfalls an jeden der im folgenden geschilderten Reaktionsschritte an.
Je 1 x 10^6 Zellen in einem Gesamtvolumen von 0,05 ml PBS wurden in EPPENDORF-Reaktionsgefäße pipettiert. Antiseren folgender Fabrikate wurden benutzt:
HYLAND DIV. TRAVENOL LAB. INC., COSTA MESA, CALIF., USA;
MILES RES. DIV. MILES LAB. INC., ELKHART, IND., USA;
NORDIC NORDIC IMM. LAB., TILBURG, NEDERLANDS.
Alle Inkubationsvorgänge fanden bei 4° C und unter weitgehendem Lichtabschluß statt.
Die Antiseren wurden zur Vermeidung unspezifischer Bindungen 60 min. bei 147 000 g ultrazentrifugiert (L2 50 B mit Rotor SW 50.1; BECKMAN INSTR., MÜNCHEN). Das obere Viertel der zentrifugierten Antiseren wurde als Überstand (Ü), der resuspendierte Rest als Bodensatz (B) bezeichnet. Nach Beendigung des direkten (II.4.1.) und des indirekten (II.4.2.) Tests wurden die markierten Zellen in einem Tropfen PBS-Glyzeringemisch (Verhältnis 1 : 9) aufgenommen und unter einem Deckglas eingebettet.

Alle Präparate wurden unter einem Phasenkontrast-Auflichtfluoreszenzmikroskop ausgewertet (Orthoplan mit Xenonlampe XBO 150 W, Erregerfilter KP 500 und BG 38; LEITZ, WETZLAR).

Für die Mitbenutzung des Mikroskops und der Ultrazentrifuge sei Herrn Prof. Dr. P. BERG (Medizinische Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin II, Direktor Prof. Dr. H.D. WALLER) sehr gedankt.

Als Kontrolle für die Spezifität der käuflichen kompletten Antiseren dienten lymphoide Zellinien mit bekanntem Oberflächenimmunglobulinspektrum, z.B. die Linie Daudi (53) mit der Expression von μ- und kappa Ketten.

Bei den Auswertungen wurden jeweils simultane- und sequentielle Doppelbestimmungen durchgeführt. Pro Versuchsansatz wurden mindestens 200 Zellen ausgezählt.

Von positiver Oberflächenimmunfluoreszenz wurde gesprochen, wenn die auftretende Membranfluoreszenz sich kappen- oder sichelförmig, bzw. als scharfbegrenzte Ringform darstellte (1, 21, 47, 50).

Um einen rein qualitativen Bewertungsmaßstab anlegen zu können, wurden Helligkeit und Kontrastreichtum folgendermaßen beurteilt :

— negativ; fehlende Fluoreszenz oder Zellen mit nicht scharf begrenzter, undeutlicher Fluoreszenz;

(+) schwach positive Fluoreszenz;

\+ positive Fluoreszenz;

++ stark positive Fluoreszenz.

II. 4. 1. Direkter Immunfluoreszenztest

Nach Vorinkubation mit jeweils 0,05 ml normalem Ziegenserum (NORDIC) für 30 min. inkubierten die Zellen ebensolange mit je 0,05 ml 1 : 8 verdünntem, Fluoreszeinmarkiertem, gegen Immunglobuline des Menschen gerichteten Ziegen - Antiserum.
Verwendet wurden :
HYLAND Anti - Human IgA-, IgG-, IgM/FITC-konjugiert ;
MILES Anti - Human IgA-, IgG-, IgM/FITC-konjugiert .

II. 4. 2. Indirekter Immunfluoreszenztest

Der Vorinkubation mit je 0,05 ml entsprechendem normalem Tierserum für 30 min. folgte im ersten Schritt die Inkubation mit jeweils 0,05 ml Antiserum gegen Immunglobuline vom Menschen.
Folgende Antiseren wurden benutzt :
HYLAND Anti - Human IgA, IgG, IgM, IgD (Ziege), Verdünnung 1 : 8, schwere Ketten spezifisch ;
HYLAND Anti - Human Kappa-L- oder Lambda-L Ketten spezifisch (Pferd), Verdünnung 1 : 4 ;
MILES Anti - Human IgA, IgG, IgM, IgD (Ziege), Verdünnung 1 : 8, schwere Ketten spezifisch ;
NORDIC Anti - Human Bence-Jones-Protein Kappa-L- bzw. Lambda-L Typ (Kaninchen), Verdünnung 1 : 4 .
Während des zweiten Schrittes inkubierten die so vorbehandelten Zellen 30 min. mit je 0,05 ml Fluoreszein-markiertem Anti-Immunglobulin-Antikörper in passender Kombination.

Folgende Antiseren wurden verwendet :

HYLAND Kaninchen - Antiserum gegen Pferdeimmunglobulin/ FITC-konjugiert, Verdünnung 1 : 4 ;

MILES Kaninchen - Antiserum gegen Ziegenimmunglobulin/ FITC-konjugiert, Verdünnung 1 : 8 ;

NORDIC Ziegen - Antiserum gegen Kaninchenimmunglobulin/ FITC-konjugiert, Verdünnung 1 : 4 ;

NORDIC Kaninchen - Antiserum gegen Ziegenimmunglobulin/ FITC-konjugiert, Verdünnung 1 : 8 .

II. 4. 3. Kappenphänomen von Oberflächenimmunglobulinen

Durch Inkubation der nach II.4.1. und II.4.2. behandelten und markierten Zellen bei 20 - 25° C für 15 - 30 min. wurde versucht, das Phänomen fluoreszierender Polkappen, das sogenannte Capping - Phänomen zu erzielen (82, 94).

II. 5. Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen mit Hilfe von I^{125}-markierten $(Fab')_2$-Anti-Ig-Antikörpern

Bei einigen LZL erfolgte der Oberflächenimmunglobulinnachweis radioautographisch. Die Präparation und Radiomarkierung Fc - freier Anti-Ig-Antikörperfragmente wurde von Herrn P.D. Dr. E.P. RIEBER (86) durchgeführt.
Bei der mikroskopischen Auswertung wurden nach Bestimmung der Hintergrundaktivität Zellen dann als positiv gewertet, wenn sie innerhalb definierter Zellareale mehr als 10 Silberkörner als der flächengleiche Hintergrund aufwiesen.

Alle Versuche wurden mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Experimentelle Chirurgie und Immunologie (ehemaliger Direktor Prof. Dr. G. RIETHMÜLLER) in Zusammenarbeit mit P.D. Dr. E.P. RIEBER, Dr. M. HADAM und Frl. M. HANEL durchgeführt.

II. 6. Nachweis intrazytoplasmatischer EBV-spezifischer Antigene (EA/VCA)

Die Tests basieren auf den Ausführungen von HENLE und HENLE (30). Anhand bekannter, EBV-Antigen positiver Zellinien, wie z.B. B 95-8 (64), wurden die EA/VCA Antikörpertiter im Serum von Patienten und Gesunden ermittelt. Im umgekehrten Fall dienten Seren mit definierten EA/VCA Antikörpertitern zum Nachweis EBV-spezifischer Antigene bei Zellinien.

Kultivierte lymphoide Zellinien wurden 3 x in PBS gewaschen, auf gereinigten Objektträgern ausgestrichen und luftgetrocknet.

Die Ausstriche wurden anschließend 4 min. in eiskaltem Azeton - Methanolgemisch (Verhältnis 1 : 0, 1 : 1, 0 : 1) fixiert, in destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet.

Die Präparate wurden dann mit den zu testenden Seren in Verdünnungen von 1 : 10 bis 1 : 5120 (Standard 1 : 160) überschichtet und 45 min. bei Raumtemperatur im ersten Schritt inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen und Trocknen erfolgte eine drei-

ßigminütige Inkubation mit präadsorbiertem Fluoreszein-markiertem Antiserum gegen Immunglobuline des Menschen unter Lichtabschluß und bei Raumtemperatur.

Verwendet wurden:

HYLAND Anti - Human IgG γ / H + L - Ketten spezifisch und HYLAND Anti - Human IgM μ - Ketten spezifisch in Standardverdünnungen von 1 : 8.

Zur Präadsorption wurden 1 x 10^7 Zellen der zu testenden Linie mit 1 ml des verdünnten fluorochromierten Antiserums gemischt und 60 min. unter ständigem Schütteln bei 37° C gehalten. Anschließend wurde 15 min. bei 800 g zentrifuggiert und nur der Überstand zur Markierung der EBV-Antigene verwendet.

Nach Beendigung des zweiten Inkubationsschrittes wurden die Objektträger 10 min. in aqua dest. gewaschen, getrocknet und mit jeweils einem Tropfen PBS - Glyzeringemisch sowie einem Deckglas bedeckt.

Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop (siehe II.4.). Zellen mit leuchtender, apfelgrüner Fluoreszenz galten als EA/VCA positiv.

Zur Berechnung des prozentualen Anteils EA/VCA-positiver Zellen wurden minimal 100 und maximal 1000 Zellen ausgezählt.

Als Kontrollen dienten Zellinien, die als EA/VCA-negativ beschrieben sind, zB. Raji (84), EBV-Antikörper negative Seren von Neugeborenen, sowie Ersatz der Seren durch Kochsalzlösung. Als positive Kontrolle diente die Virus produzierende Zellinie B 95-8 (64).

Für die Überlassung von Neugeborenen- und Kleinkinderseren sei Herrn Dr. P. OSSWALD (Universitätskinderklinik Tübingen, Direktor Prof. Dr. J. BIERICH) herzlich gedankt.

II. 7. Etablierung lymphoider Zellinien aus Nabelschnurleukozyten durch Infektion mit EBV-Partikeln

Die Zellinie B 95-8, eine virusproduzierende lymhoide Zellinie (64), wurde bis zu 14 Tagen ohne Nährmediumsubstitution bei 33° C gehalten. 2 ml des durch Abzentrifugieren der Zellen und anschließende Filtration (7103 Filter, 0,22 µm; FALCON) gewonnenen zellfreien, infektiöse Viruspartikel enthaltenden Überstands wurde zusammen mit 3 x 10^6 aus Nabelschnurblut isolierten mononukleären Zellen für mindestens zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Nach Zusatz von 2 ml RPMI 1640 Medium mit 20 % FKS wurde am folgenden Tag der Überstand durch frisches Nährmedium ersetzt und die Kulturen wie unter (II.2.) weiterbehandelt.
Die Transformationskapazität war durch die erfolgreiche Etablierung einer Zellinie bewiesen, wogegen Kontrollversuche mit Nabelschnurleukozyten des gleichen Spenders ohne Inkubation mit dem zellfreien Überstand nicht zur Etablierung führten.

II. 8. Wachstum lymphoider Zellinien in Diffusionskammern nach BENESTAD (7)

Sterile Diffusionskammern mit einer Porengröße von 0,22 µm

(MILLIPORE FILTER GmbH, NEU-ISENBURG) wurden mit 2 x 10^4 bis 5 x 10^5 lymphoiden Zellen in 0,1 ml Medium beschickt. Je zwei bis drei Kammern wurden in die Peritonealhöhle männlicher, zwischen 20 und 25 g schwerer NMRI-Mäuse implantiert, die zuvor mit 650 rad bestrahlt worden waren. Nach sieben bis vierzehn Tagen wurden die Kammern entnommen und unter gleichen Bedingungen frisch bestrahlten Mäusen reimplantiert.

Bei einem Teil der Versuche erfolgte die Implantation der Kammern in unbestrahlte Mäuse, die vorher gegen die beinhalteten Zellen durch wöchentliche intraperitoneale Injektionen von 5 x 10^3 bis 5 x 10^8 Zellen der betreffenden Linie immunisiert worden waren.

Die zwischen dem 1. und 42. Tag aus den explantierten Kammern erhaltenen Zellen wurden in Nährmedium mit Zusatz von 0,5 % Pronase (SERVA FEINBIOCHEMICA, HEIDELBERG) aufgenommen. Dem Ausschluß toter Zellen im Trypanblautest folgte die Bestimmung der absoluten Zellzahl, der Oberflächenimmunglobuline (II.4.) und des Prozentsatzes der EA/VCA-positiven Zellen (II.6.).

Die Diffusionskammertechnik wurde in dankenswerter Weise von Dr. F.J. TIGGES (43) (Medizinische Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin II, Direktor Prof. Dr. H.D. WALLER) durchgeführt.

III. E R G E B N I S S E

III. 1. Herkunft und Charakteristika von Zellinien

Die verschiedenen, bei den Versuchen verwendeten Zelllinien sind in den Tabellen I und II zusammengestellt.

Tab. I : Herkunft, Oberflächenimmunglobulin- und EA/VCA Expression bei Zellinien, die von auswärtigen Laboratorien bezogen wurden. CML : chronisch myeloische Leukämie, AML : akute myeloische Leukämie

Nr	Zellinie	Herkunft	Etabliert	Immunglobuline	EA / VCA	Quellen
1	1301					
2	1788	Normalperson periph Blut	10.68	IgM, lambda		
3	4098					
4	6410	CML periph Blut	2.64	IgG, kappa	neg.	Ikawata S et al(64)
5	7301					
6	8866	AML periph. Blut	65	IgG,IgM,kappa		
7	3W-5					
8	NC 37	Normalperson periph Blut	67	IgM,kappa	neg.	Durr FE et al (70)
9	Sert					
10	B 95-8	Marmoset Affe	73		pos.	Miller G. et al(73)
11	Raji	Burkittlymphom Gummabiopsie	7.63	IgM,kappa	neg.	Pulvertaft R J V et al(64)
12	Daudi	Burkittlymphom	67	IgM,kappa	neg.	Klein E et al(68)
13	Ramos	Burkittlymphom		IgM,kappa	neg.	Klein G. et al(75)
14	RAM-B 95-8 I	„ konvertiert				Fresen K.O. et al(76)
15	RAM-B 95-8 III	„ „				siehe 14
16	RAM-HR I K II	„ „				siehe 14
17	BJAB	Burkittlymphom	3 73	IgG,IgM,kappa	neg.	Menezes J et al(75)
18	BJA-HR I KA	„ konvertiert				Fresen K O et al(76)
19	BJA-HR I KB	„ „				siehe 18
20	BJA-B 95-8 V	„ „				siehe 18
21	P3 HR I K	Burkittlymphom	9 65	IgG	pos.	Hinuma Y et al(67)

Tab. II. : Zusammenstellung von Zellinien, die im eigenen Labor angezüchtet und kultiviert wurden. HZL : Haarzelleukämie, Mon : mononukleäre Zellen, Leu : Leukozyten

Zellinie	Spender	Geschlecht / Alter	Angesetzte Zellzahl	Dauer der lag-Phase
A_1	H. H. Normalperson periph.Blut	♂ / 36	4×10^6 Leu	- 29
A_2			8×10^6 Leu	-21
A_3			1×10^7 Leu	-21
A_4			2×10^7 Leu	-21
A_5			$1{,}2 \times 10^7$ Leu	-21
A_6			4×10^6 Mon	-21
A_7			$8 \quad 10^6$ Mon	-21
W_1	B. R. Infektiöse Mononukleose	♂ / 16	5×10^6 Mon	-27
W_2			6×10^6 Mon	-27
W_5			9×10^6 Mon	-27
Y_1	G. Neugeborener Nabelschnurblut B 95-8 superinf.	♂	2×10^6 Mon	-22
Y_2			4×10^6 Mon	-22
Y_5			1×10^7 Mon	-22
Z_{1-10}	L. Neugeb. B 95-8 superinf.	♂	3×10^6 Leu	-23
HZ_1	F. W. HZL periph. Bl.	♂ / 62	2×10^7 Leu	-29
HZ_2			1×10^7 Leu	-29
HZ_3	P. S. HZL periph. Bl.	♂ / 36	2×10^7 Leu	-29
HZ_4			1×10^7 Leu	-29

Man unterscheidet Tumorzellinien (TZL) von lymphoblastoiden ZL (LBZL). Während TZL meistens von den Lymphomzellen des Burkitt Tumors abstammen und die Merkmale des Originaltumors tragen, lassen sich LBZL von normalen oder neoplastischen hämopoetischen Geweben EBV-Antikörper positiver Spender ableiten.

Vertreter der TZL sind die Linien Raji, Daudi, Ramos und

BJAB; aus den EBV-negativen Zellinien Ramos und BJAB entstanden durch Infektion mit EBV Partikeln Virus-DNS enthaltende Konversionsformen (19).
Die Linien A, W, Y, Z, HZ, 7301, NC 37, Serf, sowie RPMI 1301, 1788, 4098, 6410 und 8866 gehören zu den LBZL.
Bei den im eigenen Labor etablierten ZL handelt es sich ebenfalls um LBZL. A entstammt den Leukozyten eines gesunden Spenders, HZ wurde aus den Leukozyten von Patienten mit Haarzelleukämie, die Linie W aus den Zellen eines an infektiöser Mononukleose Erkrankten gewonnen. Den ZL Y und Z liegen Nabelschnurleukozyten Neugeborener zugrunde, die nach Infektion mit zellfreien Überständen der Linie B 95-8 zur Kultur angesetzt worden waren.
Die ZL B 95-8 entstand aus den Leukozyten eines Marmosettaffen; hierbei handelt es sich um eine Virus produzierende Linie (64).

III. 2. Etablierung und Wachstum lymphoider Zellinien

Nach zytochemischer Differenzierung zeigten Vergleiche zwischen isolierten mononukleären Zellen und Leukozyten, daß die mononukleäre Fraktion bei Etablierungsversuchen um die Hälfte niedrigere Zellzahlen benötigte. Anwesende Granulozyten hatten keinen Einfluß auf Erfolg oder Dauer der Etablierung.
Die zur Etablierung einer ZL notwendige minimale Leukozytenzahl war unabhängig von der Höhe des EBV-Antikörpertiters der Spender.

Testreihen zur Feststellung der zur Etablierung einer ZL notwendigen minimalen Leukozytenzahl bei verschiedenen Patientengruppen ergaben folgende ansteigende Tendenz : IM, M. Hodgkin, Sarkoidose, Gesunde. Bei Gesunden waren beispielsweise 2 - 3 mal mehr Leukozyten zur Etablierung nötig als bei Mononukleosekranken.

Bei der Ermittlung der initialen Zellzahl, die entsprechend der Größe der verwendeten Kulturbehälter, und damit der der Monolayerformation zur Verfügung stehenden Oberfläche benötigt wurde, zeigte sich, daß eine erfolgreiche Etablierung in 16 ml Glasröhrchen nur mit Zellzahlen von über 5×10^6 möglich war.

Die Latenzphase dauerte bei eigenen ZL zwischen 21 und 29 Tagen (Tab.II). Innerhalb der Population bestand eine umgekehrte Proportionalität zwischen angesetzter Leukozytenzahl und der Dauer der Latenzphase.

Das Ende der lag-Phase war durch Auflösung der Bodenmonolayerformation, durch ansteigende Zellzahlen und durch die Bildung von Zellkonglomeraten gekennzeichnet, wobei auffiel, daß LBZL häufiger als LZL zur Konglomeratbildung neigten.

Die Verdopplungszeit der Zellen betrug ca. 50 Stunden. Etablierte ZL wurden stationär in Konzentrationen zwischen 9×10^5 und 1×10^6 Zellen/ml gehalten. Höchste Zelldichten von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml fanden sich bei Kulturen, die längere Zeit ohne Nährmediumsubstitution gehalten worden waren.

III. 3. Verhalten lymphoider Zellinien in Diffusionskammern nach Implantation in bestrahlte- und unbestrahlte Mäuse

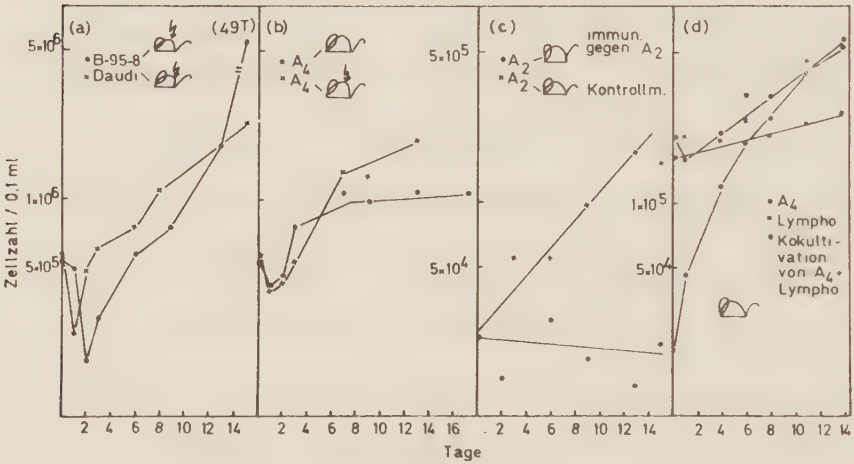

Abb. 1 : Wachstumsverläufe lymphoider Zellinien in Diffusionskammern nach Implantation in die Peritonealhöhle von Mäusen

(a) B 95-8 und Daudi Zellen in bestrahlten Mäusen

(b) Zellinie A 4 in bestrahlten- und unbestrahlten Mäusen

(c) Zellinie A 2 in unbestrahlten, gegen A 2 vorimmunisierten Mäusen und Kontrolltieren

(d) Kokultivation der Linie A 4 mit autologen frischen Lymphozyten in unbestrahlten Mäusen

In Abb.1a sind die Wachstumskurven der TZL Daudi und der Affenzellinie B 95-8 in bestrahlten Mäusen dargestellt. Schon nach 15 Tagen lagen die Zellkonzentrationen beider

Linien wenigstens zehnfach über den maximal erreichten in vitro Werten.

Abb.1b zeigt das Verhalten von A 4 Zellen in bestrahlten- und unbestrahlten Mäusen. Die erreichten Zelldichten waren bei unbestrahlten Tieren um die Hälfte niedriger.

Abb.1c verdeutlicht, daß es bei nicht bestrahlten Mäusen, die in wöchentlichen Abständen mit i.p. Injektionen von 5×10^3 bis 5×10^8 Zellen der Linie A 2 vorimmunisiert worden waren, zu einer Wachstumshemmung der implantierten A 2 Zellen kam, wie Vergleiche mit den Wachstumskurven in nicht immunisierten Kontrollmäusen zeigten.

In Abb.1d ist das Experiment einer in vivo Kokultivation von Zellen der Linie A 4 mit frischen mononukleären Zellen, die initial zur Etablierung dieser ZL geführt hatten, dargestellt. Auch ein 7,5-facher Überschuß an frischen Leukozyten führte nicht zur Wachstumshemmung der lymphoblastoiden Zellen.

Während- und nach der Mäusepassage wurde keine Änderung wichtiger Zellparameter wie der Expression von Oberflächenimmunglobulinen oder des EA/VCA Komplexes beobachtet. Die Etablierung von Zellinien in Diffusionskammern gelang nicht. Intraperitoneale- oder subkutane Injektion von Zl führten bei bestrahlten- und unbestrahlten Mäusen lediglich zu einer unspezifischen entzündlichen Gewebsreaktion ohne histologischen Hinweis auf Malignität.

III. 4. Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen bei mononukleären Zellen mittels direkter- und indirekter Immunfluoreszenztechnik (IFZT)

Immunglobuline an der Oberfläche mononukleärer Zellen wurden unter Verwendung kompletter Fluoreszein-markierter Anti-Ig-Antiseren (direkter Test) oder mittels fluorochromierter Anti-Anti-Ig-Antiseren (indirekter Test) nachgewiesen.
Bei den getesteten Zellen wies die erhaltene Fluoreszenz in Abhängigkeit von den verschiedenen Testparametern große Unterschiede hinsichtlich Größe, Form, Helligkeit und Kontrastreichtum auf (Abb. 2).

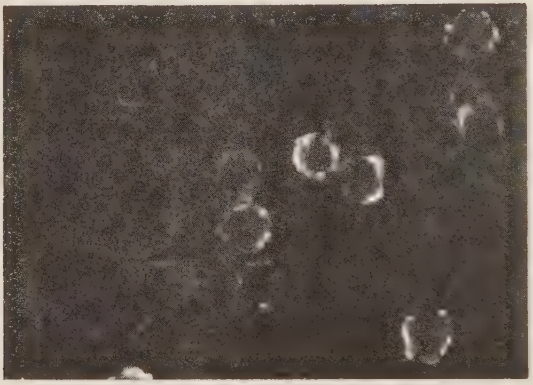

Abb. 2 : Darstellung von Oberflächenimmunglobulinen der Klasse IgM bei der Zellinie Daudi

Die im direkten und indirekten Test verwendeten Antiseren waren aus hyperimmunisierten Spendertieren gewonnen worden. Um die Spezifität der kompletten Fluoreszein-markierten Anti-Ig-Antikörper zu erhöhen, wurden in Versuchsreihen die zu testenden Zellen zunächst mit normalem Tierserum ent-

sprechend der Spezies des Antiserumspenders vorinkubiert, um unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und der Zelloberfläche zu reduzieren.
Falsch positive Reaktionen bei der Verwendung kompletter Antikörper zum monospezifischen Oberflächenimmunglobulinnachweis entstehen ebenfalls durch Bindung spontan aggregierter Gammaglobuline an den auf B-Lymphozyten vorhandenen Fc-Rezeptor (3, 13). Durch Ultrazentrifugation der Antiseren wurde versucht, Gammaglobulinaggregate zu separieren (8).
Bei den im direkten IFZT untersuchten ZL fand einmal der Überstand des ultrazentrifugierten Antiserums (Ü), zum anderen der resuspendierte, gammaglobulinaggregatreiche Bodensatz (B) Verwendung. Bei zwei der getesteten Linien, Z 1 und 7301, konnte bei dem Vergleich der aufgetretenen Fluoreszenzen kein Unterschied nach Benutzung von Überstand und Bodensatz gefunden werden. Bei den ZL Daudi, Raji, Z 2 und HZ 1 fanden sich innerhalb der Ig-Klassen bei nicht zentrifugierten Antiseren unspezifische Fluoreszenzen, die häufig schollig, verwaschen und sehr hell wirkten. Bei Verwendung des zentrifugierten Antiserumüberstandes (Ü) konnten diese nicht mehr beobachtet werden.

Tab. III veranschaulicht an Hand der TZL Daudi den Einfluß der Vorinkubation mit normalem Tierserum und die Verwendung ultrazentrifugierter Antiseren im direkten- und im indirekten Test. Während sich im direkten Test kein Einfluß auf das Versuchsergebnis nachweisen ließ, zeigte sich im indirekten Test eine Steigerung der Spezifität, die durch

die kombinierte Anwendung beider Methoden noch gesteigert werden konnte.

Tab. III : Vergleichende Darstellung des Oberflächenimmunglobulinnachweises bei Verwendung zentrifugierter-und unzentrifugierter Antiseren, sowie Vorinkubation mit und ohne Ziegenserum an der ZL Daudi

Direkter Test ohne Ziegenserum
AK_1 nicht zentrifugiert

Anti	IgA	IgG	IgM
	-	-	+

Indirekter Test ohne Ziegenserum
AK_{I+II} nicht zentrifugiert

Anti	IgA	IgG	IgM
	+	+	+

Direkter Test ohne Ziegenserum
AK_1 zentrifugiert

Anti	IgA	IgG	IgM
	-	-	+

Indirekter Test ohne Ziegenserum
AK_{I+II} zentrifugiert

Anti	IgA	IgG	IgM
	-	(+)	+

Direkter Test mit Ziegenserum
AK_1 nicht zentrifugiert

Anti	IgA	IgG	IgM
	-	-	+

Indirekter Test mit Ziegenserum
AK_{I+II} nicht zentrifugiert

Anti	IgA	IgG	IgM
	(+)	(+)	+

Direkter Test mit Ziegenserum
AK_1 zentrifugiert

Anti	IgA	IgG	IgM
	-	-	+

Indirekter Test mit Ziegenserum
AK_{I+II} zentrifugiert

Anti	IgA	IgG	IgM
	-	-	+

In Tab. IV und Tab. V sind die Ergebnisse des direkten- und indirekten IFZT an lymphoiden Zellinien zusammengefasst. An beiden Testreihen wurde gleichzeitig der Einfluß einer Vorinkubation der Zellen mit normalem Tierserum untersucht. Bei Anwendung des direkten Tests konnten die Immunglobulinklassen IgA und IgG nur bei der Linie BJAB gefunden werden. Die meisten Zellinien exprimierten IgM. Ein Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen gelang nicht bei 1301, 4098, 6410, 8866, B 95-8 und Serf. Die Vorinkubation mit Ziegenserum trug im direkten Test nicht zur Erhöhung der Spezifität bei.

Der indirekte Test erbrachte neben IgM auch häufig den Nachweis von IgA, IgG und sogar IgD. Hier führte die Vorinkubation mit Ziegenserum zu einer Zunahme der Spezifität. Insgesamt betrachtet, erwies sich der indirekte Test gegenüber dem direkten als wesentlich empfindlicher, er führte aber häufig zu falsch positiven Ergebnissen.

Wegen der größeren Spezifität ist mit der beschriebenen Methode dem direkten Test der Vorzug zu geben.

Die auf lymphoiden Zellinien nachgewiesenen Oberflächenimmunglobuline vom Typ der leichten Ketten (L-Ketten) zeigt Tab. VI. Die Testung wurde unter Verwendung verschiedener Produkte käuflicher Antiseren durchgeführt.

War mit Präparat I eine Diskriminierung der beiden Typen nicht möglich, so ergaben Versuche mit Präparat II einen spezifischen Nachweis der Expression von kappa- oder lambda Ketten. Bei den meisten ZL fanden sich leichte Ketten

vom kappa-Typ in Prozentsätzen zwischen 5 und 80 %. Die schwache, simultane Expression beider Typen von L-Ketten zeigte sich bei der Linie B 95-8.

Tab. IV : Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen bei Zellinien im direkten IFZT. Darstellbarkeit unter Vorinkubation mit Ziegenserum (MZ) und ohne Ziegenserum (OZ)

Zellinien	Anti IgA		Anti IgG		Anti IgM		Anti IgM,A,G	
	OZ	MZ	OZ	MZ	OZ	MZ	OZ	MZ
1301	-	-	-	-	-	-	-	-
1788	-	-	-	-	+	(+)	+	(+)
4098	-	-	-	-	-	-	-	-
6410	-	-	-	-	-	-	-	-
7301	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)
8866	-	-	-	-	-	-	-	-
3W-5	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-
NC 37	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-
B95-8	-	-	-	-	-	-	-	-
Serf	-	-	-	-	-	-	-	-
Raji	-	-	-	-	+	(+)	+	(+)
Daudi	-	-	-	-	+	+	+	+
Ramos	-	-	-	-	+	(+)	(+)	+
RAM-B95-8I	-	-	-	-	+	+	+	+
RAM-B95-8III	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)
RAM-HRIKII	-	-	-	-	+	+	+	+
RAM-HRIKIII	-	-	-	-	+	+	+	+
BJAB	-	-	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)
BJA-HRIKA	-	-	-	-	+	+	+	+
BJA-HRIKB	-	-	-	-	+	+	+	+
BJA-B95-8V	-	-	-	-	+	+	+	+

Tab. V : Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen bei Zellinien im indirekten IFZT. Darstellbarkeit unter Vorinkubation mit Ziegenserum (MZ) und ohne Ziegenserum (OZ)

Zellinien	Anti IgA		Anti IgG		Anti IgM		Anti IgD	
	OZ	MZ	OZ	MZ	OZ	MZ	OZ	MZ
1301	-	-	(+)	-	(+)	(+)	-	-
1788	-	-	(+)	-	+	(+)	(+)	-
4098	(+)	+	+	+	-	-	-	+
6410	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-
7301	+	(+)	+	(+)	+	+	(+)	-
8866	-	-	-	-	(+)	-	-	-
3W-5	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-
NC 37	(+)	-	+	-	+	+	(+)	-
B95-8	-	-	(+)	-	-	-	-	-
Serf	-	-	-	-	-	-	-	-
Raji	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-
Daudi	+	+	+	+	+	+	(+)	+
Ramos	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-
RAM-B95-8I	+	-	+	(+)	+	(+)	-	-
RAM-B95-8III	+	(+)	+	+	+	+	-	-
RAM-HR I K II	(+)	-	+	+	+	+	-	-
RAM-HR I K III	+	-	+	+	+	+	-	-
BJAB	(+)	-	+	(+)	(+)	(+)	(+)	-
BJA-HR I KA	(+)	-	+	+	+	(+)	-	-
BJA-HR I KB	(+)	-	+	-	+	(+)	-	-
BJA-B95-8V	+	-	+	+	(+)	(+)	-	-

Tab. VI : Nachweis der Oberflächenimmunglobuline vom kappa- und lambda Typ bei Zellinien im indirekten IFZT mit zwei verschiedenen Antiseren (I und II). ng : nicht gemacht, Angaben in Prozent

	Anti kappa-L		Anti lambda-L	
	I	II	I	II
1301	+ 54	(+)	+ 89	-
1788	ng	(+)	ng	-
6410	+ 90	-	+ 88	(+)
7301	+ 72	+ 60	+ 63	-
8866	+ 87	+ 70	+ 84	-
NC 37	ng	+ 80	ng	-
B 95-8	+ 78	(+) 7	+ 84	(+) 2
Raji	ng	(+)	ng	-
Daudi	+ 88	+ 85	+ 62	-
RAM-B 95-8 I	ng	-	ng	+ 90
RAM-B 95-8 III	+ 95	-	+ 96	(+)
BJAB	+ 59	+ 60	+ 61	-
BJA-HR I KA	+ 71	(+)	+ 59	-
BJA-HR I KB	+ 81	+ 80	-	-
BJA-B 95-8 V	+ 57	+ 85	-	-
Ramos	ng	-	ng	+ 80

Bei nahezu sämtlichen getesteten ZL und auch bei frisch angereicherten mononukleären Zellen von Patienten konnte das Auftreten von Kappen oder Caps beobachtet werden. Die bei 4^{o} C zunächst diffus oder ringförmig angeordneten fluoreszierenden Antikörper verdichteten sich bei Raumtemperatur nach ca. 15 Minuten zu Polkappen und imponierten noch nach Stunden als konzentrierter fluoreszierender Punkt.

Abb. 3 : Auftreten des Kappenphänomens bei Daudi-Zellen
Nachweis von Immunglobulinen der Klasse IgM

III. 5. Vergleich IFZT - Radioautographie (RAG)
bei dem Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen

Das Risiko unspezifischer Bindungen an den Fc-Rezeptor und damit des Erhalts falsch positiver Fluoreszenz bei Verwendung kompletter fluorochromierter Antikörper kann nur durch Fc-Stück freie (Fab')$_2$ - Antikörperfragmente vermieden werden.

In Tab. 7 sind die an Hand getesteter ZL mit kompletten Antikörpern immunfluoreszenztechnisch nachgewiesenen Oberflächenimmunglobuline quantitativ mit denen bei Verwendung radioaktiv markierter (Fab')$_2$-Fragmente entsprechender Immunglobulinklassen verglichen.

Tab. VII : Vergleich zweier Nachweismethoden für Oberflächenimmunglobuline und Fc-Rezeptoren an Zellinien. IFL : direkter IFZT, RAG : Radioautographie, ng : nicht gemacht, Zahlenangaben in Prozent

Zellinien	Anti IgA		Anti IgG		Anti IgM		Anti IgD		Anti kappa		Anti lambda		Fc
	IFL	RAG	IFL	RAG	IFL	RAG	IFL	RAG	IFL	RAG	IFL	RAG	RAG
BJAB	-	-	+18	+4	(+)90	+90	(+)<1	-	+60	+	-	-	-
BJA-HR I KA	-	-	-	+7	+ 93	+87	-	-	+ 83	+	-	-	-
BJA-HR I KB	-	-	-	+5	+ 91	+92	(+)<1	-	+ 85	+	-	-	-
A_3	-	ng	-	ng	(+)	ng	ng	ng	+ 80	+ 9	(+)	-	ng
A_7	-	ng	-	ng	(+)	ng	ng	ng	+ 71	+11	(+)	-	ng

Neben der qualitativen Übereinstimmung ergab ein durchgeführter T-Test bei dem paarweisen Vergleich der innerhalb einer Immunglobulinklasse ausgezählten Prozentsätze positiver Zellen eine Wahrscheinlichkeit P von jeweils mehr als 50 %, d.h. es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Methoden. Bei dem Nachweis leichtkettiger Ig stimmten die Ergebnisse nur qualitativ überein, die bis zu neunmal höheren Prozentsätze bei Ergebnissen des IFZT waren signifikant von denen der RAG verschieden. Hieraus ergibt sich die Folgerung, daß die Diskriminierung der Oberflächenimmunglobuline vom Typ der leichten Ketten mit dem indirekten IFZT zwar in qualitativer Hinsicht verwertbar, die quantitative Auswertung jedoch wenig sinnvoll ist.

III. 6. Expression von Oberflächenimmunglobulinen während der Etablierung und Kultivierung von Zellinien

Mittels des direkten IFZT wurde bei der LBZL 7301 während einer achttägigen Kulturdauer die quantitative Expression von Oberflächenimmunglobulinen bestimmt. In der Latenzphase bei Zelldichten von 2,1 x 10^5 Zellen/ml wiesen 2 % der Zellen an ihrer Oberfläche IgM auf, in der Phase exponentiellen Wachstums mit 5,3 x 10^5 Zellen/ml fand sich IgM bei 4 % und in der stationären Phase mit 7,5 x 10^5 Zellen/ml bei 8 % der Zellen.

Bei den im eigenen Labor etablierten ZL erfolgte die Bestimmung der Oberflächenimmunglobuline unmittelbar nach der

Etablierung und anschließend im Abstand von drei Monaten (Tab. VII). Die anfängliche Expression von IgA (eine ZL) und IgM (neun ZL) war drei Monate später in zwei Fällen nicht mehr nachweisbar. Bei der Erstbestimmung der leichten Ketten wiesen die meisten ZL zunächst beide Typen auf, ein Vierteljahr später war in der Regel nur noch Immunglobulin vom kappa-Typ zu finden. Lediglich bei der ZL W 5 hatte sich der lambda-Klon durchgesetzt.
Sechs Monate nach der Etablierung produzierte nur noch eine ZL IgM, kappa-Ketten wurden noch von zwei Zellinien exprimiert.
Es zeigte sich also, daß nach längerer Kultivierung von Zellinien die Stärke der Immunglobulinexpression nachließ. Bei der simultanen Ausprägung von kappa- und lambda Ketten muß auf einen polyklonalen Ursprung geschlossen werden, wobei nach längerer Kulturdauer ein Klon überwiegt.

Tab. VIII : Expression von Oberfächenimmunglobulinen während längerer Kulturdauer von LBZL. Nachweis im direkten- und indirekten IFZT

ng : nicht gemacht

Zellinien	Anti IgA		Anti IgG		Anti IgM		Anti kappa		Anti lambda	
	9.76	12.76	9.76	12.76	9.76	12.76	9.76	12.76	9.76	12.76
A_2	-	-	-	-	+	(+)	+	+	(+)	-
A_3	-	-	-	-	(+)	(+)	+	+	(+)	-
A_4	-	-	-	-	(+)	(+)	+	+	(+)	-
A_5	-	ng	-	ng	(+)	ng	+	ng	(+)	ng
A_7	-	ng	-	ng	+	ng	+	ng	(+)	ng
W_1	(+)	ng	-	ng	(+)	ng	(+)	ng	-	ng
W_2	-	-	-	-	(+)	-	+	+	+	-
W_5	-	-	-	-	-	-	(+)	-	+	+
Y_1	-	-	-	-	-	-	+	(+)	+	-
Y_2	ng	-	ng	-	ng	-	ng	-	ng	-
Y_5	-	ng	-	ng	(+)	ng	+	ng	(+)	ng
Z_1	-	ng	-	ng	-	ng	(+)	ng	(+)	ng
Z_6	-	ng	-	ng	-	ng	+	ng	(+)	ng
Z_7	-	-	-	-	(+)	-	(+)	(+)	-	-
Z_9	-	-	-	-	-	-	(+)	+	-	-
Z_{10}	-	-	-	-	-	-	(+)	+	-	-

III. 7. Expression von Oberflächenimmunglobulinen bei frisch isolierten mononukleären Zellen von Patienten

Frisch isolierte mononukleäre Zellen von Spendern mit lymphatischen Systemerkrankungen wurden im direkten IFZT auf Oberflächenimmunglobuline untersucht; die gewonnenen Ergebnisse wurden mit denen der parallel durchgeführten Radioautographie verglichen (Tab. IX).
Innerhalb der Immunglobulinklassen IgG und IgM ergab der zwischen den quantitativen Wertepaaren durchgeführte T-Test keine signifikanten Unterschiede.
Bei den leichten Ketten der Immunglobuline war kein eindeutiger Vergleich möglich.
Kontrollen mit den angereicherten Zellen Gesunder ließen innerhalb der Klassen IgG und IgM vereinzelt Positivitäten erkennen, diese lagen jedoch unter einem Prozent der entsprechenden Gesamtzellzahl.

III. 8. Bildung von Spontanrosetten mit Schaferythrozyten bei Zellinien und bei isolierten mononukleären Zellen von Patienten

Tab. X faßt die Ergebnisse von Rosettentests an ZL und mononukleären Zellen von Leukosepatienten zusammen. Das Kontrollkollektiv bestand aus 16 gesunden Personen. Bei 34 getesteten ZL lag der Mittelwert spontan rosettenbildender Zellen bei 0,13 %, innerhalb der Patientengruppe bei 5,4 % und in der Kontrollgruppe Gesunder bei 61,8 %.

Tab. IX : Nachweis der Oberflächenimmunglobuline mononukleärer Zellen von Lymphompatienten. Vergleich zwischen IFZT und RAG.
CLL : chronisch lymphatische Leukämie,
BZL : B-Zell Lymphom, HZL : Haarzelleukämie,
ng : nicht gemacht, Zahlenangaben in Prozent

Name	Diagnose	Anti IgA		Anti IgG		Anti IgM		Anti kappa		Anti lambda	
		IFL	RAG	IFL	RAG	IFL	RAG	IFL	RAG	IFL	RAG
C.K.	CLL	-	2	-	3	+ 56	73	(+)	92	-	2
G.L.	BZL(PB)	-	7	(+) 2	<1	+ 10	67	ng	2	ng	77
G.L.	BZL(ln)	-	ng	(+) 1	ng	+ 78	ng	ng	ng	ng	ng
A.M.	CLL	-	ng	(+) 4	ng	+ 52	ng	ng	ng	ng	ng
M.D.	HZL	-	2	-	<1	+ 81	86	-	<1	-	98
K.F.	HZL	-	8	+ 41	45	(+) 2	3	ng	ng	ng	ng
W.R	HZL	-	<1	-	<1	+ 23	44	(+)	ng	(+)	ng
F.W.	HZL	-	3	+ 65	88	(+) 10	7	(+)	95	(+)	< 1

Tab. X : Spontanrosettentest bei LBZL und mononukleären Zellen von Patienten und Gesunden.
BZL : B-Zell Lymphom, CLL : chronisch lymphatische Leukämie, IMZT : Immunozytom,
Zahlenangaben in Prozent

1301	0	T_1	0	F.B. BZL	1
1788	0	Z_8	0	C.K. CLL	2
4098	0	A_2	0	G.L. IMZT PB	10
6410	0	A_3	0	G.L. IMZT Lnn	6
7301	0	A_4	0	A.M. CLL	8
8866	0	A_5	0		
3W-5	0	A_7	0		
NC 37	0	W_2	1		
B 95-8	0	W_5	0		
Serf	0	Y_1	0		
Raji	0	Z_7	0		
Daudi	1,5	Z_9	3		
Ramos	0	Z_{10}	0		
RAM - B 95-8 I	0				
RAM - B 95-8 III	0				
RAM - HR 1 K II	0				
RAM - HR 1 K III	0				
BJAB	0				
BJA - HR 1 KA	0				
BJA - HR 1 KB	0				
BJA - B 95-8 V	0				

Normale Kontrollpersonen
N = 16
$\bar{x}$ = 61,8
S = 51-76

III. 9. Nachweis des EA/VCA Antigenkomplexes

Zur Fixierung von Targetzellen wurde kaltes Azeton oder Methanol verwendet. Nach der Markierung mit fluorochromierten Antikörpern trat bei Methanolfixierung eine helle, homogene Fluoreszenz auf; bei der Fixierung in reinem Azeton waren die Zellkonturen zerflossen und eine flockige Fluoreszenz erkennbar. Durch Mischen beider Fixierlösungen im Verhältnis 1 : 1 gelang eine optimale Darstellung des EA/VCA Komplexes.
Fixierte Testzellen, die im indirekten Test zu Kontrollzwecken nur mit dem Fluoreszein-markierten Antiserum inkubierten, d.h. ohne Vorinkubation mit EBV-Antikörper-haltigem Serum, zeigten teilweise eine deutliche Fluoreszenz. Wurde dagegen der Fluoreszein-markierte Antikörper zuvor mit den zu testenden Zellen präadsorbiert, konnte dieses Phänomen nicht mehr beobachtet werden. Erst durch Präadsorption wurde die falsch positive Darstellung des EA/VCA Komplexes vermieden und damit die Spezifität der Nachweismethode gesteigert.

Bei dem Nachweis der Oberflächenimmunglobuline von B 95-8 Zellen konnte keine Expression von IgG und IgM gefunden werden (Tab. IV). Mit fluoreszierenden Antikörpern gegen IgG und IgM gelang jedoch bei der gleichen ZL die Darstellung EBV-spezifischer Antigene (Abb. 4). Dabei konnte, wie auch für andere Zellinien, gezeigt werden, daß bei dem Nachweis des EA/VCA-Komplexes keine Kreuzreaktion zwischen

Immunglobulinen der Klassen IgG und IgM und den EA/VCA Antigenen auftrat. Im umgekehrten Fall ließen sich bei den EBV-negativen ZL Raji, Daudi und BJAB Oberflächenimmunglobuline nachweisen (Tab. IV), während der EA/VCA Test bei Verwendung von Antiseren gegen entsprechende Immunglobulinklassen negativ ausfiel. Dies gilt als weiterer Hinweis für die hohe Spezifität des Tests.
Das Ergebnis der Austestung aller zur Verfügung stehender ZL auf das Vorhandensein EA/VCA-positiver Zellen ist in Tab. XI wiedergegeben. Bei frisch etablierten Linien wurde der Test nach vier Monaten wiederholt; nach diesem Zeitraum hatten drei ZL ihre anfängliche Positivität verloren.

Abb. 4 : Nachweis des EA/VCA Antigenkomplexes bei der ZL B 95-8

Tab. XI : Nachweis des EA/VCA Komplexes bei ZL. Teilweise Doppelbestimmungen unmittelbar nach der Etablierung und vier Monate später.
ng : nicht gemacht

Zellinien	VCA	Zellinien	VCA
1301	+	A_2	+/+
1788	+	A_3	+/+
4098	ng	A_4	+/+
6410	+	A_5	+/+
7301	+	A_7	+/+
8866	+	W_1	-/-
3W-5	ng	W_2	-/-
NC 37	+	W_5	-/-
B 95-8	+	Y_1	+/-
Serf	ng	Y_2	-
Raji	-	Y_5	-/-
Daudi	-	Z_6	+/-
Ramos	-	Z_7	-
RAM-B95-8 I	-	Z_9	-
RAM-B95-8 III	-	Z_{10}	-
RAM-HR I K II	-	T_3	+/+
RAM-HR I K III	-	Z_8	+/-
BJAB	-		
BJA-HR I KA	-		
BJA-HR I KB	-		
BJA-B95-8V	-		

Die Wachstumskurve der ZL B 95-8 bei gleichzeitigem Nachweis EA/VCA-positiver Zellen zeigt Abb. 5. Die initiale Zellzahl von 1 x 10^5 Zellen/ml war am zehnten Tag auf 1,5 x 10^6 Zellen/ml angestiegen; der Anteil EA/VCA-positiver Zellen betrug anfänglich 6 x 10^3 Zellen/ml und erreichte 7,5 x 10^4 Zellen/ml am neunten Kulturtag.

Ähnliche Verhältnisse ergaben sich bei Wachstumsverläufen der Linie 1788.

Der Gipfel der EA/VCA Expression fiel bei beiden ZL in den Beginn der Phase stationären Wachstums. Während dieser Zeit enthielt der zellfreie Überstand der Kulturen die höchste Konzentration an infektiösen EBV-Partikeln, mit denen nach Infektion von Nabelschnurleukozyten die Etablierung lymphoider Zellinien gelang.

An einer B 95-8 Kultur wurde der Einfluß der Temperatur auf Wachstum und EA/VCA Expression untersucht. Kulturen, die zum Vergleich bei 33° C und bei 37° C gehalten wurden entwickelten größte Zelldichten und höchste Anteile EA/VCA-positiver Zellen um den neunten Kulturtag. Während die absoluten Zellzahlen nur geringfügig differierten, erbrachte die bei 33° C gehaltene Kultur 31,3 % höhere Anteile EA/VCA-positiver Zellen.

In Abb. 6 sind Zellzahlen und Anteile EA/VCA-positiver Zellen von acht Wachstumskulturen der Linie B 95-8 zusammengefaßt. Nach siebentägiger Kultur der mit Ausgangswerten von je 1 x 10^5 Zellen/ml bei 2,5 % Anteil EA/VCA-positiver Zellen gestarteten Einzelsuspensionen wurden Zellzahlen von durchschnittlich 7,9 x 10^5 Zellen/ml $\pm$ 39,2 % er-

reicht; der Anteil EA/VCA-positiver Zellen stieg auf Mittelwerte von 4,5 % ± 33 %. Dabei bestand eine lineare Korrelation zwischen erreichter Zellzahl und der Höhe der EA/VCA Expression.

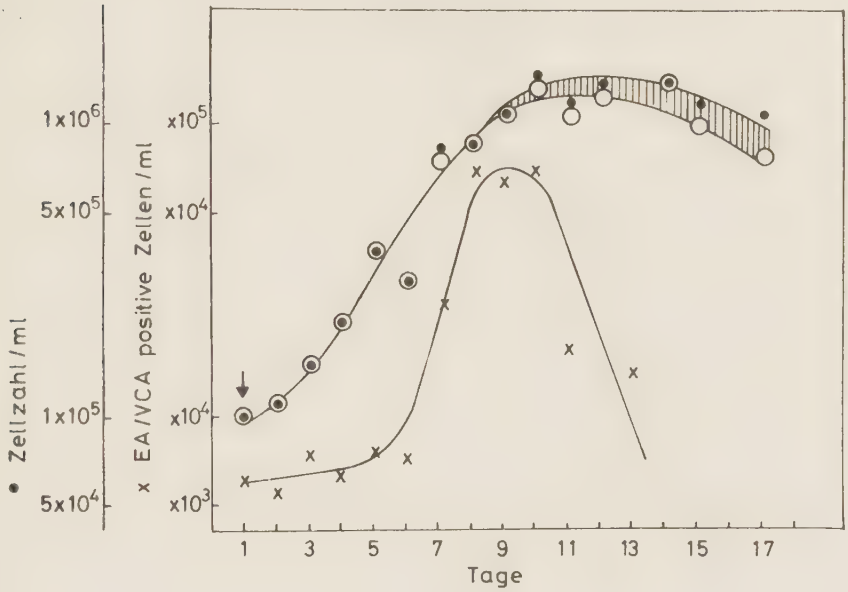

Abb. 5 : Wachstumskurve der ZL B 95-8 bei gleichzeitigem Nachweis des Anteils EA/VCA-positiver Zellen

- • Gesamtzellzahl/ml
- o vitale Zellen/ml
- × EA/VCA-positive Zellen/ml

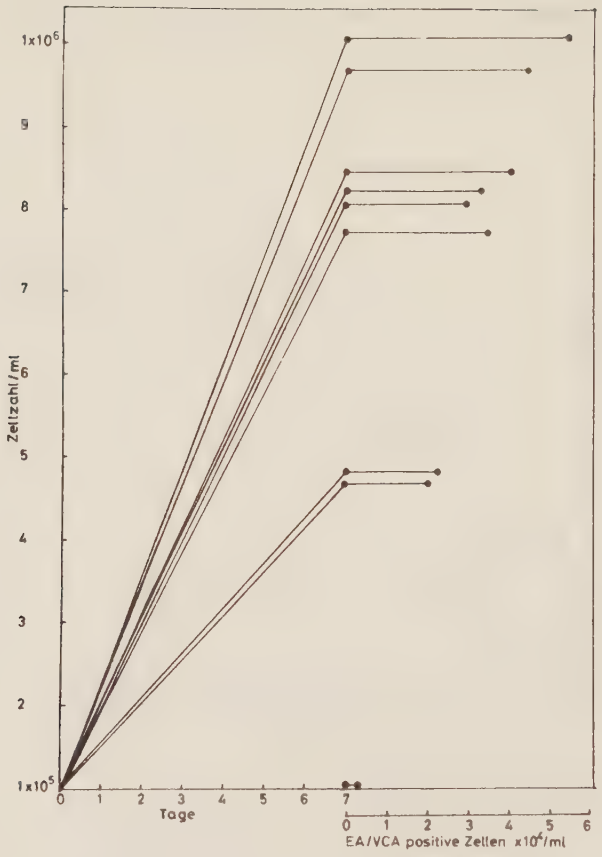

Abb. 6 : Wachstumskinetiken von acht Kulturen der ZL B 95-8 bei gleichzeitigem Nachweis EA/VCA-positiver zellen. Ausgangswerte : 1 x 10^5 Zellen/ml bei 2,5 % EA/VCA-positiven Zellen, Versuchsdauer : 7 Tage

Anhand der Virus produzierenden, EA/VCA - positiven ZL B 95-8 wurden im direkten IFZT die EA/VCA-Antikörpertiter in Nabelschnurblut, sowie in den Seren von Gesunden und von Patienten mit IM und anderen Erkrankungen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. XII dargestellt.
Bei drei Patienten, zwei mit akuter IM und einer mit einem Herzvitium, waren Antikörpertiter noch bei Serumverdünnungen von 1 : 320 (Weg), 1 : 1280 (Wil) und sogar 1 : 2560 (Ley) vorhanden. Diese Titer wurden bei Verwendung von Antiseren der Klasse IgM erhalten. Die parallel bestimmten Anti-EA/VCA Titer bei Benutzung von Anti-IgG Serum lagen niedriger und sind in Abb. 7 zusammengestellt.
Mit den Seren gesunder Spender war in drei Fällen keine positive Reaktion zu erhalten, in einem Fall fand sich ein Antikörpertiter von 1 : 40 gegen IgG (Tab. XII).
Als Kontrollen dienten die als EA/VCA - negativ beschriebenen ZL Ramos und BJAB; bei Verwendung dieser Linien war mit keinem Testserum eine Fluoreszenz im EA/VCA-Test zu erzielen.

In Abb. 8 ist das IgG/IgM-Profil des Anti-EA/VCA Titers im Serum eines an akuter IM erkrankten Patienten erfaßt. Bei Krankheitsbeginn übertraf der Anti-IgM- den Anti-IgG Titer um das vierfache, fünf Monate später hatte sich das Verhältnis umgekehrt und der Anti- IgG Titer war doppelt so hoch wie der Anti-IgM Titer.

Tab. XII : Anti-EA/VCA Titer im Serum von Patienten und Gesunden gemessen an der ZL B 95-8 mit Anti-IgG Antikörpern.
IM : infektiöse Mononukleose, HV : Herzvitium, NP : Normalperson

Antiserum	Diagnose / Alter		EA/VCA-Test bei Serumverdünnung		
			1:10	1:40	1:160
Erl.	IM		+	-	-
Hau.	IM	16	+	-	-
Hey.	NP	36	+	+	-
Kie.	IM	26	+	-	-
Lau.	IM		-	-	-
Ley.	IM		+	+	+
Vei.	IM	27	+	-	-
Wil.	IM	16	+	+	+
Ede	NP	1	-	-	-
Fre.	NP	9	-	-	-
Pri.	HV	7	+	-	-
Sen.	NP	13	-	-	-
Tro.	HV	3	+	+	-
Weg	HV	3	+	+	+
Neu.	NP	0	-	-	-

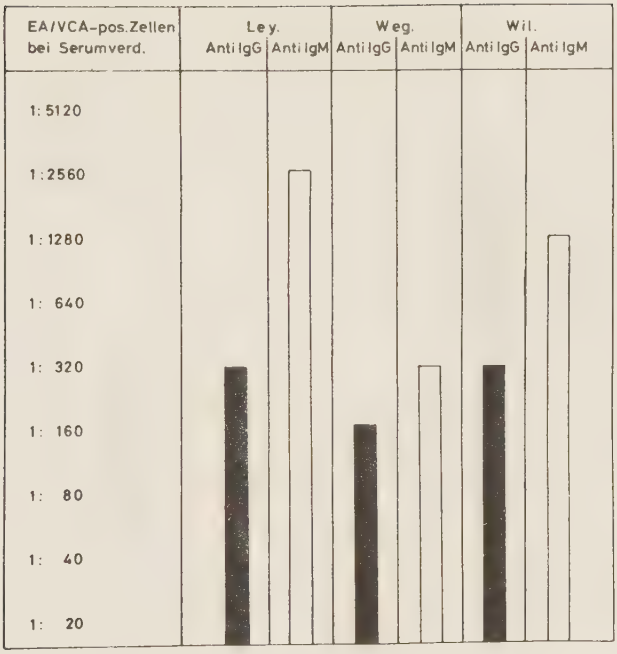

Abb. 7 : Vergleich der Anti-EA/VCA Titer im Serum von Patienten unter Berücksichtigung des Anti-IgG/IgM Profils, austitriert an der ZL B 95-8

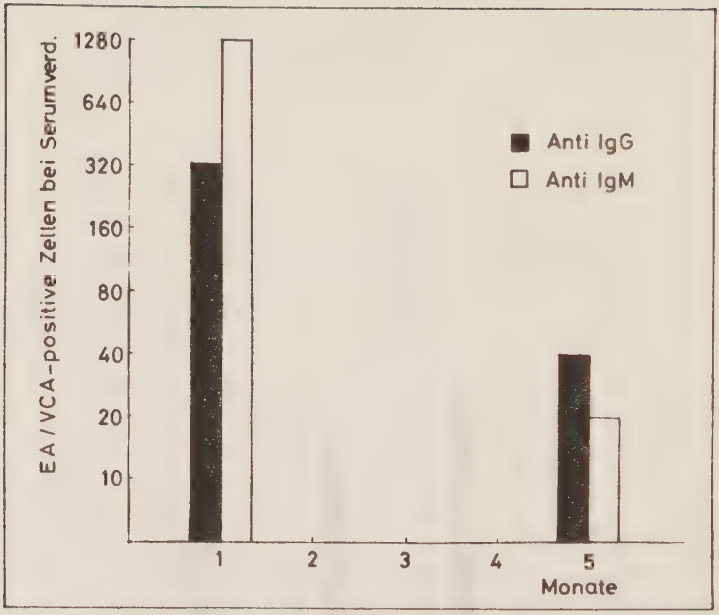

Abb. 8 : IgG/IgM-Profil des Anti-EA/VCA Titers im Serum eines an akuter IM Erkrankten

IV. D I S K U S S I O N

IV. 1. Lymphoide Zellinien und die Existenz von Vorläuferzellen

Permanent wachsende lymphoide Zellen werden nach NILSSON und PONTÉN in Lymphomzellinien und in lymphoblastoide Zellinien unterteilt (75).

Wird Biopsiematerial des Burkitt Lymphoms zur Kultur angesetzt, so entwickeln sich nach einer kurzen Latenzphase kontinuierlich wachsende Tumorzellinien, die hinsichtlich ihrer Oberflächenimmunglobulinexpression (53), des Isoenzymmusters der GL-6-P-DH (5, 17, 18) und bestimmter chromosomaler Merkmale den Zellen des Originaltumors gleichen (99). Man nimmt deshalb an, daß Tumorzellen unter in vitro Bedingungen ihre Proliferation als ZL fortsetzen können (75).

Lymphoblastoide ZL entstehen durch Kultivation mononukleärer Zellen von Spendern, die Träger eines EBV-Antikörpertiters sind. Man postuliert deshalb, daß sich im peripheren Blut Seropositiver Vorläuferzellen befinden, von denen unter Kulturbedingungen das Wachstum von ZL ausgeht (4, 6). Bei Leukozyten seronegativer Spender gelang die Kultivierung von ZL nicht, woraus geschlossen werden muß, daß Vorläuferzellen erst auftreten, nachdem eine Infektion mit EBV stattgefunden hat (23, 24, 72, 73, 74).

Zwei neoplastische Erkrankungen des Menschen, das Burkitt-Lymphom (11, 12) und das Nasopharyngealkarzinom (46) wer-

den mit einer EBV Infektion in Verbindung gebracht.
Bei Affen ist die direkte Induktion lymphoretikulärer Malignome mit diesem Virus möglich (15, 91).
Bei der Diskussion um die onkogene Potenz des EBV besitzt die infektiöse Mononukleose insofern Modellcharakter, als sie in der Regel benigne verläuft, EBV aber als kausaler krankheitsauslösender Faktor gesichert ist (38). Bei dieser Erkrankung vermutet man, daß die proliferierenden B-Lymphozyten durch einen kontrollierenden T-Zell-Mechanismus am weiteren Wachstum gehindert werden (93). Bei angeborenen T-Zell-Defekten kann die Infektion mit EBV zu einer malignen lymphoproliferativen Erkrankung führen (22, 39).
Die hohe Etablierungseffizienz der Leukozyten Mononukleosekranker läßt vermuten, daß diese Patienten mehr Vorläuferzellen als Gesunde besitzen.
Da eine direkte Isolierung bisher nicht möglich war, kann man versuchen auf indirektem Wege von Merkmalen LBZL auf den Charakter dieser Vorläuferzellen rückzuschließen.
Um Vorläuferzellen quantitativ zu erfassen wurden nach VON HEYDEN (42) folgende kulturtechnischen Möglichkeiten angewandt:

a) Kulturansatz unterschiedlicher Zellfraktionen.
b) Erfassung derjenigen minimalen Zellzahlen, die gerade noch zur Etablierung einer ZL führen.
c) Vergleiche zwischen der Anzahl von Präkursorzellen bei Gesunden und Patienten mit IM.

Die Ergebnisse zeigten, daß die Vorläuferzellen in der

mononukleären Fraktion zu vermuten sind. Während die Etablierung von ZL mit Lymphozyten und Monozyten EBV-seropositiver Spender gelang, war dies bei Granulozytenkulturen nicht der Fall (III.2.).

Aus der Tatsache, daß die Länge der Latenzphase der angesetzten Leukozytenzahl umgekehrt proportional war (III.2.) wurde geschlossen, daß eine größere Anzahl von Vorläuferzellen im Ansatz zu einer schnelleren Etablierung führt. Zur Etablierung von ZL aus Spenderleukozyten waren bei Patienten mit IM geringere initiale Zellzahlen notwendig als bei EBV-AK - positiven Gesunden (III.2.), was auf eine größere Anzahl von Vorläuferzellen bei Mononukleosekranken hinweist.

IV. 2. Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen auf lymphoiden ZL

Die in dieser Arbeit untersuchten ZL hatten eindeutig B-Zell-Charakter. Dafür sprechen der Nachweis von Oberflächenimmunglobulinen (Tab. IV, Tab. V) und die fehlende Spontanrosettenbildung mit Hammelerythrozyten (98) (Tab. X). Kurz nach der Etablierung konnte bei vielen ZL neben der Expression von Ig einer Klasse der schweren Ketten das simultane Auftreten beider Typen leichtkettiger Immunglobuline beobachtet werden, während sich nach längerer Kulturdauer meist nur noch ein Typ nachweisen ließ (Tab. VII). NILSSON (72,75) und BÉCHET (4, 5) führen dieses Phänomen auf eine anfänglich polyklonale Ig-Produktion zurück, die

nach einer in vitro Selektionsphase zur Dominanz eines Klons führt.

Zum Nachweis von Immunglobulinen mittels des IFZT fanden bei den meisten Versuchen komplette Antikörper Verwendung. Ihr Nachteil besteht im Vorhandensein des sog. Fc-Teils, mit dem Kopplungen an einen entsprechenden, auf Oberflächen von B-Zellen befindlichen Rezeptor möglich sind (13). Bei dem monospezifischen Nachweis von Immunglobulinen ist deshalb mit dem Auftreten falsch positiver Ergebnisse zu rechnen. Hochspezifische Nachweise sind nur mit Fc-freien ($Fab')_2$-Anteilen von Immunglobulinen zu erzielen (96). Fc-freie Antikörperfragmente lassen sich jedoch nur unter großem experimentellen Aufwand erhalten (87).
An Zellinien mit bekanntem Oberflächenimmunglobulinspektrum (zB. Daudi mit IgM und kappa) (39) sollte deshalb die Spezifität eines Nachweises mit kompletten Antikörpern kontrolliert werden. Desweiteren wurden in parallelen Versuchen an ZL die Ergebnisse des Immunfluoreszenztests mit denen radioaktiv markierter ($Fab')_2$-Bruchstücke verglichen (Tab. VII, Tab. IX).
Es zeigte sich, daß die Verwendung kompletter Antikörper nur bei Durchführung des direkten Tests sinnvoll ist (III.5.). Der sensitivere, aber wesentlich unspezifischere indirekte Test führte häufig zu falsch positiven Ergebnissen. Da ein Nachweis leichter Ig-Ketten nur mittels des indirekten Tests möglich war, sind die gewonnenen Ergebnisse bezüglich des Auftretens von kappa- oder lambda

Ketten mit Zurückhaltung aufzunehmen (Tab. VI).

IV. 3. Nachweis des EA/VCA-Antigenkomplexes und Bestimmung der EBV-Antikörpertiterhöhe in Seren

70 bis 90 % der erwachsenen Bevölkerung Westeuropas weist Antikörpertiter gegen EBV auf (71, 89). Nur ein Bruchteil dieser Gruppe erkrankt unter dem klinischen Bild einer infektiösen Mononukleose. Bei viralen Erkrankungen mit nicht eindeutig abklärbarer Ätiologie besteht deshalb die Notwendigkeit eines Ausschlußes der Diagnose IM.
Während bei seronegativen Adoleszenten eine EBV Infektion zu den klassischen Symptomen einer Mononukleose führt (16, 83), verläuft die Erkrankung bei Kleinkindern aber auch bei Erwachsenen häufig abortiv oder klinisch inapparent (31, 32, 38). Hier kann die Diagnose nur durch die Erfassung des EBV-Antikörpertiters eindeutig gestellt werden.
Die akute Krankheitsphase ist durch den steilen Anstieg EBV-spezifischer AK der Klasse IgM charakterisiert (2, 27). IgG-AK steigen langsamer an und bleiben wahrscheinlich lebenslang auf einem erhöhten Niveau (27). Aus diesem Grunde ist nach einmal durchgemachter Erkrankung eine Zweitmanifestation sehr selten und wurde nur bei alten Menschen beobachtet (38).
Bei der hier beschriebenen Methode zum Nachweis EBV-assoziierter Antigene wurden EA und VCA nicht isoliert dargestellt, obwohl, eine Diskriminierung möglich ist (30, 34). Anti-EA wird während der akuten Phase einer IM von 70 %

der Erkrankten gebildet, während sich ein Anti-VCA Titer zu einem späteren Zeitpunkt in nahezu allen Fällen nachweisen läßt (36) und jahrelang persistiert (32, 37, 70). Die EA/VCA Expression von ZL läßt sich mit Antikörpern der Immunglobulinklassen IgG und IgM nachweisen (34, 38). Dabei besteht die Möglichkeit einer Kreuzreaktion mit den Oberflächen-Ig der betreffenden Zellen. Die Nachweismethode für EBV-Antigene bedient sich zwar fixierter Zellen, um den intrazytoplasmatisch gelegenen EA/VCA-Komplex darzustellen, eine Reaktion mit den Oberflächen-Ig der devitalisierten Zellen ist dadurch jedoch nicht auszuschließen.

Die hohe Spezifität des EA/VCA Nachweises zeigte sich insbesondere an ZL, bei denen mit Antikörpern der Klasse IgG und IgM ein Nachweis dieses Komplexes gelang, eine Oberflächenimmunglobulinexpression unter Verwendung derselben AK aber nicht gefunden werden konnte (III.9.).

Im umgekehrten Fall fanden sich bei ZL Oberflächen-Ig, während der EA/VCA Test mit Antiseren gegen dieselben Ig-Klassen negativ ausfiel (Tab. XI, Tab. IV).

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß eine Kreuzreaktion bei den Nachweismethoden des EA/VCA-Komplexes und der Oberflächenimmunglobuline trotz Verwendung von Antikörpern der gleichen Ig-Klasse nicht auftritt.

Bei den ersten methodischen Versuchsansätzen des Immunfluoreszenztests ergaben Kontrollen mit EBV-AK negativen Seren vereinzelt positive Ergebnisse. Diese Pseudopositivität konnte durch Präadsorption der fluorochromierten AK an die

Targetzellen verhindert werden (III.9.).
Die in den Versuchen erhaltenen EBV-Antikörpertiter wurden von einem kleinen, nicht repräsentativen Patientenkollektiv gewonnen. Dabei fand die in der Literatur beschriebene Tatsache Bestätigung, daß Nabelschnurblut und die Seren Neugeborener keine EBV-Antikörpertiter, die Seren von IM-Patienten dagegen starke Titerschwankungen aufweisen (55). Bei Letzteren ist dies möglicherweise auf unterschiedliche Zeitpunkte von Blutentnahmen zurückzuführen. Die Schwere der Erkrankung schien in keinem festen Zusammenhang mit der Höhe der gefundenen Antikörpertiter zu stehen (Tab. XII). Eine Erhöhung der EBV-Antikörpertiter ist ebenfalls durch passive Übertragung möglich. So beobachtet man Titeranstiege nach Bluttransfusionen und nimmt auch eine diaplazentare Übertragung von der Mutter auf das Kind an (31).
HENLE beschrieb signifikant erhöhte EBV-Antikörpertiter bei Kindern mit Herzvitien, die Bluttransfusionen erhalten hatten oder an die Herzlungenmaschine angeschlossen worden waren (33). Auch bei einem unserer Patienten, einem Kind mit Herzvitium, fanden sich sehr hohe EA/VCA-Antikörpertiter (Tab. XII).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Etablierung lymphoblastoider Zellinien ist nur mit den Leukozyten von Spendern, die EBV-Antikörpertiter aufweisen, nicht aber mit denen Seronegativer möglich.
Aus Nabelschnurleukozyten Neugeborener lassen sich nur dann ZL etablieren, wenn eine Infektion mit EBV-haltigen Überständen vorausging.
Man kann annehmen, daß unter in vitro Bedingungen das Wachstum lymphoider ZL von EBV enthaltenden Vorläuferzellen ausgeht. Der Nachweis von EBNA, der streng mit der Anwesenheit von EBV-Genom korreliert, gelang nur bei LBZL und den Leukozyten Mononukleosekranker, nicht aber bei Gesunden.
Eine Aussage über die eventuelle Malignität der Vorläuferzellen ist nicht möglich. Indirekte Malignitätskriterien wie das Zellwachstum nach Heterotransplantation LBZL in Mäuse ergaben widersprüchliche Ergebnisse.
LBZL und ihre Vorläuferzellen haben B-Zell Charakter, da sie Oberflächenimmunglobuline exprimieren, und keine E-Rosetten mit Hammelerythrozyten bilden.
Bei frisch etablierten LBZL ist die simultane Expression beider Typen leichtkettiger Immunglobuline möglich; dies weist auf einen polyklonalen Ursprung hin. Nach längerer Kulturdauer kommt es häufig zu einem Nachlassen der Immunglobulinproduktion und zur Dominanz meist eines Ig-produzierenden Klons.
Der Oberflächenimmunglobulinnachweis bei ZL erfolgte im direkten und indirekten Immunfluoreszenztest mittels kom-

pletter Antikörper, bei deren Verwendung falsch positive Ergebnisse durch Kopplung an die auf B-Zellen vorhandenen Fc-Rezeptoren möglich sind. Vergleiche mit Ergebnissen, die unter Verwendung hochspezifischer (Fab')$_2$-Antikörper gewonnen wurden, ergaben nur bei Anwendung des direkten Tests signifikante Übereinstimmungen.

Bei dem Nachweis des EA/VCA-Komplexes EBV-positiver ZL konnte ein Kreuzreagieren mit eventuell vorhandenen Oberflächenimmunglobulinen gleicher Klassen ausgeschlossen, und damit die hohe Spezifität des Tests bewiesen werden. Anhand virusproduzierender EA/VCA-positiver ZL wurden die EA/VCA-Antikörpertiter im Serum von Gesunden und Patienten bestimmt. Neugeborenenseren wiesen keine Antikörpertiter auf, die Seren Gesunder und Mononukleosekranker zeigten große Titerschwankungen. Bei Patienten mit IM fand sich im Anschluß an das akute Krankheitsstadium eine Verschiebung im IgG/IgM-Profil zuungunsten des IgM-Titers.

VI. L I T E R A T U R

1 ASAMER, H.:
Zur immunozytologischen Charakterisierung immunkompetenter Lymphozyten.
Wiener klin. Wschr. 84, 401 (1972)

2 BANATVALA, J.E., BEST, J., and WALKER, D.K.:
Epstein-Barr virus-specific IgM in infectious mononucleosis, Burkitt lymphoma, and nasopharyngeal carcinoma.
Lancet, I, 1202-1208 (1972)

3 BASTEN, A., WARNER, N.L., and MANDEL, T.:
A receptor for antibody on B-lymphocytes. II. Immunochemical and elektron microscopy characteristics.
J. exp. Med. 135, 627-642 (1972)

4 BÉCHET, J.M., NILSSON, K., and PONTÉN, J.:
Establishment of multiple lymphoblastoid lines from single lymphnodes and study of their immunoglobulin synthesis.
Int. J. Cancer 11, 58-63 (1973)

5 BÉCHET, J.M., FIALKOW, P.J., NILSSON, K., KLEIN, G., and SINGH, S.:
Immunoglobulin synthesis and glucose-6-phosphate-dehydrogenase as cell markers in human lymphoblastoid cell lines.
Exp. Cell. Res. (1975)

6 BELPOMME, D., MINOWADA, J., and MOORE, G.:
Are some human lymphoblastoid cell lines established from leucemic tissues actually derived from normal leucocytes ?
Cancer 30, 282-287 (1972)

7 BENESTAD, H.B.:
Formation of granulocytes and macrophages in diffusion chamber cultures of mouse blood leucocytes.
Scand. J. Haemat. 7, 279-288 (1970)

8 VAN BOXEL, J.A. and BUELL, D.N.:
IgD on cell membranes of human lymphoid cell lines with multiple immunoglobulin classes.
Nature Vol 251, 443-444 (1974)

9 BØYUM, A.:
Separation of white blood cells.
Nature 204, 793-794 (1964)

10 BØYUM, A.:
Separation of leucocytes from blood and bone marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 98 (1968)

11 BURKITT, D.P.:
A sarcoma involving the jaws in African children.
Brit. J. Surg. 46, 218-223 (1958)

12 BURKITT, D.P.:
A tumor safari in east and central Africa.
Brit. J. Cancer 16, 379-386 (1962)

13 DICKLER, H.B., KUNKEL, H.G.:
Interaction of aggregated gamma-globulin with B-lymphocytes.
J. Exp. Med. 136, 191-196 (1972)

14 EDITORIAL :
Oral excretion of E.B. virus.
Lancet II, 811-812 (1973)

15 EPSTEIN, M.A., HUNT, R.D., and RABIN, H.:
Pilot experiments with EB virus in owl monkeys (Aotus trivirgatus). I. Reticuloproliferative disease in an inoculated animal.
Int. J. Cancer 12, 309 (1973)

16 EVANS, A.S., NIEDERMAN, J.C., and Mc.COLLUM, R.W.:
Seroepidemiologic studies on infectious mononucleosis with EB virus.
New Engl. J. Med. 279, 1121-1127 (1968)

17 FIALKOW, P.J., KLEIN, G., GARTLER, S.M., and CLIFFORD, P.:
Clonal origin for individual Burkitt tumor.
Lancet I, 384-386 (1970)

18 FIALKOW, P.J., KLEIN, E., KLEIN, G., CLIFFORD, P., and SINGH, S.:
Immunoglobulin and glucose-6-phosphate dehydrogenase as marker of cellular origin in Burkitt Lymphoma.
J. Exp. Med. 138, 89-102 (1973)

19 FRESEN, K.O., ZUR HAUSEN, H.:
Establishment of EBNA-expressing cell lines by infection of Epstein-Barr-Virus (EBV)-genome-negative human lymphoma cells with different EBV strains.
Int. J. Cancer 17, 161-166 (1976)

20 FRÖLAND, S.S.:
Human lymphocytes. A probable marker of T-lymphocytes.
Scand. J. Immunol. 1, 269 (1972)

21 FRÖLAND, S.S., NATVIG, J.B.:
Lymphocytes with membrane-bound immunoglobulin (B-lymphocytes) in new-born-babies.
Clin. exp. Immunol. 11, 495 (1972)

22 GATTI, R.A., and GOOD, R.A.:
Occurence of malignancy in immunodeficiency diseases.
Cancer 28, 89 (1971)

23 GERBER, P., and MONROE, J.:
Studies in leucocytes growing in continous culture derived from normal human donors.
J. Nat. Cancer Inst. 40, 855-866 (1968)

24 GERBER, P., and HOYER, B.H.:
Induction of cellular DNA synthesis in human leucocytes by Epstein-Barr virus.
Nature, 228, 1056-1058 (1970)

25 GERGELY, L., KLEIN, G., and ERNBERG, I.:
Appearance of Epstein-Barr virus-associated antigens in infected Raji cells.
Virologie, 45, 10 (1971 b)

26 GREAVES, F.M., BROWN, G., and DICKINSON, A.B.:
Epstein-Barr virus binding sites on lymphocyte subpopulations and the origin of lymphoblasts in cultured lymphoid cell lines and in blood of patients with infectious mononucleosis.
Clin. Immunol. Immunopathol. 3, 514-524 (1975)

27 HAMPAR, B., HSU, K.C., MARTOS, L.M., and WALKER, J.L.:
Serologic evidence that a herpes-type virus is the etiologic agent of heterophile-positive infectious mononucleosis.
Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 1407-1411 (1971)

28 ZUR HAUSEN, H., and SCHULTE-HOLTHAUSEN, H.:
Presence of EB virus nucleic acid homology in a "virusfree line of Burkitt tumor" cells.
Nature 227, 245-248 (1970)

29 ZUR HAUSEN, H., DIEHL, V., WOLF, H., SCHULTE-HOLTHAUSEN, H., and SCHNEIDER, U.:
Occurence of Epstein-Barr-Virus genomes in human lymphoblastoid cell lines.
Nature N.B. 237, 189 (1972)

30 HENLE, G., and HENLE, W.:
Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma.
J. Bacteriol. 91, 1248-1256 (1966)

31 HENLE, G., HENLE, W., and DIEHL, V.:
Relation of Burkitt's tumor-associated herpes type virus to infectious mononucleosis.
Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 94-101 (1968)

32 HENLE, G., and HENLE, W.:
Observations on childhood infections with Epstein-Barr virus.
J. Infect. Dis. 121, 303-310 (1970)

33 HENLE, W., HENLE, G., SCRIBA, M., JOYNER, G.R., HARRISON, F.S., V.ESSEN, R., PALOHERMO, J., and KLEMOLA, E.:
Antibody responses to the Epstein-Barr virus and Cytomegalo virus after open heart and other surgery.
N. Engl. J. Med. 282, 1068-1074 (1970)

34 HENLE, W., HENLE, G., ZAJAC, B.A., PEARSON, G., WAUBKE, R., and SCRIBA, M.:
Differential reactivity of human serums with early antigens induced by Epstein-Barr virus.
Science Vol. 169, 188-190 (1970)

35 HENLE, G., HENLE, W., and KLEIN, G.:
Demonstration of two distinct components in the early antigen complex of Epstein-Barr virus infected cells.
Int. J. Cancer 8, 272-282 (1971)

36 HENLE, G., HENLE, W., KLEIN, G., GUNVEN, P., CLIFFORD, P., MORROW, R.W., and ZIEGLER, J.L.:
Antibodies to early Epstein-Barr virus induced antigens in Burkitt's lymphoma.
J. Nat. Cancer Inst. 46, 861-871 (1971)

37 HENLE, W., HENLE, G., NIEDERMAN, J.C., KLEMOLA, E., and HALTIA, K.:
Antibodies to Epstein-Barr virus-induced early antigens in infectious mononucleosis.
J. Infect. Dis. 124, 58-67 (1971)

38 HENLE, W., and HENLE, G.:
Epstein-Barr virus and infectious mononucleosis.
N. Engl. J. Med. 288, 263-264 (1973)

39 HENLE, W., and HENLE, G.:
Epstein-Barr virus related serology in Hodgkin's disease.
J. Nat. Cancer Inst. Monogr. 36, 79-84 (1973)

40 V. HEYDEN, H.W., and V. HEYDEN, D.:
Cytological characteristics of normal human blood cells in culture before establishment into lymphoid cell lines.
Cell and Tissue Kinet. 6, 271-279 (1973)

41 V. HEYDEN, H.W., and V. HEYDEN, D.:
Establishment of lymphoid cell lines in relation to number of leucocytes, surface area of monolayer formation and feeding procedure.
In vitro 8, 309-315 (1973)

42 V. HEYDEN, H.W.:
Etablierung von lymphoiden Zellinien aus Leukozyten sowie Isoenzymverteilungsmuster der sauren Phosphatasen als diagnostisches Kriterium bei hämatologischen Erkrankungen.
Habil. Schrift (1977)

43 V. HEYDEN, H.W., TIGGES, F.J., STUCKSTEDTE, H., and GÄRTNER, V.H.:
Growth of lymphoid cell lines in diffusion chambers implanted in mice.
(in Vorbereitung)

44 HINUMA, Y., and GRACE, J.T.:
Cloning of immunoglobulin-producing human leucemic and lymphoma cells in long-term cultures.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124, 107 (1967)

45 HIRSHAUT, Y., GLADE, P., VIEIRA, L.O., AINBENDER, E., DVORAK, B., and SILTZBACH, L.E.:
Sarcoidosis, another disease associated with serologic evidence for herpes like infection.
N. Engl. J. Med. 283, 502-506 (1970)

46 HO, H.C.:
Nasopharyngeal carcinoma.
Adv. Cancer Res. 15, 57-92 (1972)

47 HUBER, CH., ASAMER, H., HUBER, H., WIGZELL, H., and BRAUNSTEINER, H.:
Zur funktionellen Differenzierung lymphatischer Zellen: Lymphozyten mit Immunglobulindeterminanten und Bindungsfähigkeit für Immunkomplexe bei der Maus.
Z. Ges. exp. Med. 156, 34 (1971)

48 JOHANSSON, B., KLEIN, G., HENLE, W., and HENLE, G.:
Epstein-Barr virus (EBV)-associated antibody patterns in malignant lymphoma and leucemia. I. Hodgkin's disease.
Int. J. Cancer 6, 450-462 (1970)

49 JOHANSSON, B., HOLM, G., MELLSTEDT, H., HENLE, G., HENLE, W., SODERBERG, G., KLEIN, G., and KILLANDER, D.:
Epstein-Barr virus (EBV)-associated antibody patterns in relation to the deficiency of cell mediated immunity in patients with Hodgkin's disease. In: DE THÉ, G., EPSTEIN, M.A., and ZUR HAUSEN, H. (ed) Oncogenesis and herpes viruses II, part 2, 237-248
IARC, Lyons (1976)

50 JONDAL, M., HOLM, G., and WIGZELL, H.:
Surface markers on human T- and B- lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells.
J. Exp. Med. 136, 207-215 (1972)

51 JONDAL, M., and KLEIN, G.:
Surface markers on human T- and B- lymphocytes. II. Presence of Epstein-Barr virus receptors on B-lymphocytes.
J. Exp. Med. 138, 1365-1378 (1973)

52 KLEIN, G., CLIFFORD, P., KLEIN, E., and STJERNSWÄRD, J.:
Search for tumor specific immune reactions in Burkitt lymphoma patients by the membrane immunofluorescence reaction.
Acad. Sci.(Wash.), 55, 1628-1635 (1966)

53 KLEIN, E., KLEIN, G., NADKARNI, J.S., NADKARNI, J.J., WIGZELL, H., and CLIFFORD, P.:
Surface IgM k-specificity on Burkitt lymphom cells in vivo and derived culture lines.
Cancer Res. 28, 1300-1301 (1968)

54 KLEIN, G., DOMBOS, L., and GOTHOSKAR, B.:
Sensitivity of Epstein-Barr virus (EBV) producer and non-producer human lymphoblastoid cell lines to superinfection with EB-virus.
Int. J. Cancer 10, 44-57 (1972)

55 KLEIN, G.:
The Epstein-Barr virus.In : The herpes viruses (Ed.: A.S. KAPLAN) P.: 521-555
Academic Press, New York (1973)

56 KLEIN, G., GIOVANELLA, B.C., LINDAHL, T., et al.:
Direct evidence for the presence of Epstein-Barr virus DNA and nuclear antigen in malignant epithelial cells from patients with poorly differentiated carcinoma of the nasopharynx.
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 4737-4741 (1974)

57 KLEIN, G.:
The Epstein-Barr virus and neoplasia.
N. Engl. J. Med. 293, 1353-1357 (1975)

58 KLEIN, G.:
Studies on Epstein-Barr virus genome and the EBV-determined nuclear antigen in human malignant disease.
Cold spring habour symp. Vol. 39, 783-790 (1975)

59 KLEIN, G., SVEDMYR, E., JONDAL, M., and PERSSON, P.O.:
EBV-determined nuclear antigen (EBNA)-positive cells in the peripheral blood of infectious mononucleosis patients.
Int. J. Cancer 17, 21-26 (1976)

60 LINDAHL, T., KLEIN, G., REEDMAN, B.M., JOHANSSON, B., and SINGH, S.:
Relationship between Epstein-Barr virus (EBV)-DNA and the EBV-determined nuclear antigen (EBNA) in Burkitt lymphoma biopsies and other lymphoproliferative malignancies.
Int. J. Cancer 13, 764-772 (1974)

61 MENEZES, J., LEIBOLD, W., KLEIN, G., and CLEMENTS, G.:
Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus (EBV)-negative lymphoblastoid B-cell line (BJAB) from an exceptional EBV-genome-negative African Burkitt's lymphoma.
Biomedicine 22, 276-284 (1975)

62 MICHLMAYR, G., HUBER, Ch., FINK, U., FALKENSAMMER, H., and HUBER, H.:
T-Lymphozyten in peripherem Blut und Lymphknoten bei lymphatischen Systemerkrankungen.
Schweiz. Med. Wschr. 104, 815 (1974)

63 MILLER, G.:
Human lymphoblastoid cell lines and Epstein-Barr virus: a review of their interrelationship and their relevance to the etiology of leucoproliferative states in man.
Yale J. Biol. Med. 43, 358-384 (1971)

64 MILLER, G., and LIPMAN, M.:
Release of infectious EBV by transformed marmoset leucocytes.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 190-192 (1973)

65 MILLER, G.:
The oncogenicity of Epstein-Barr virus.
J. Infect. Dis. 130, 187-205 (1974)

66 MOORE, G.E., GERNER, R., and FRANKLIN, A.:
Culture of normal human leucocytes.
J. A. M. A. 199, 519-524 (1967)

67 MOORE, G.E., and MC LIMANS, W.F.:
The life span of the cultured normal cell: Concepts derived from studies of human lymphoblasts.
J. Theoret. Biol. 20, 217-226 (1968)

68 MOORE, G.E.:
The culture of human lymphocytoid cell lines.
In: Methods in cancer research (Ed: H. BUSCH)
Acad. Press, New York, N.Y. P.: 423-453 (1970)

69 MOORE, G.E., and GERNER, R.E.:
Cancer immunity-hypothesis and clinical trial of lymphocyte therapie for malignant disease.
Ann. Surg. 172, 733-739 (1970)

70 NIEDERMAN, J.C., MC COLLUM, R.W., HENLE, G., and HENLE, W.:
Infectious mononukleosis. Clinical manifestations in relation to EB virus antibodies.
J. Amer. Med. Assoc. 203, 205-209 (1968)

71 NIEDERMAN, J.C., EVANS, A.S., SUBRAHMANYAN, L., and MC COLLUM, R.W.:
Prevalence, incidence and persistence of EB virus antibody in young adults.
N. Engl. J. Med. 282, 361-365 (1970)

72 NILSSON, K.:
High frequency establishment of human immunoglobulin-producing lymphoblastoid lines from normal and malignant lymphoid tissue and and peripheral blood.
Int. J. Cancer 8 432-442 (1971 b)

73 NILSSON, K., KLEIN, G., HENLE, W., and HENLE, W.:
The establishment of lymphoblastoid lines from adult and foetal human lymphoid human lymphoid tissue and its dependence on E.B.V.
Int. J. Cancer 8, 443-450 (1971)

74 NILSSON, K., KLEIN, G., HENLE, G., and HENLE, W.:
The role of EBV in the establishment of lymphoblastoid cell line from adult and foetal lymphoid tissue.
I. A. R. C. Monography 2, 285-290 (1972)

75 NILSSON, K., and PONTÉN, J.:
Classification and biological nature of established human hematopoietic cell lines.
Int. J. Cancer 15, 321-341 (1975)

76 NONOYAMA, M., and PAGANO, J.:
Detection of Epstein-Barr viral genome in non-productive cells.
Nature N.B. 233, 103-106 (1971)

77 OSGOOD, E.E., and BROOKE, J.H.:
Continuous tissue culture of leucocytes from human leucemic bloods by application of "gradient" principles.
Blood 10, 1010-1022 (1955)

78 PAGANO, J.S., HUANG, C.H., and LEVINE, P.:
Absence of Epstein-Barr viral DNA in American Burkitt's lymphoma.
New. Engl. J. Med. 289 , 1395-1399 (1973)

79 PATTENGALE, P.K., SMITH, R.W., and GERBER, P.:
Selective transformation of B-lymphocytes by EB virus.
Lancet I, 93-94 (1973)

80 PATTENGALE, P.K., SMITH, R.W., and PERLIN, E.:
Atypical lymphocytes in acute infectious mononucleosis.
N. Engl. J. Med. 291, 1145-1148 (1974)

81 PERNIS, B., FORNI, L., and AMANTE, L.:
Immunglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes.
J. Exp. Med. 132, 1001 (1970)

82 PERNIS, B.E.:
Mobility and tumor of receptors on leucocyte surface.
Europ. Ges. f. Immunol., Bern, 2. - 5.10. 1972

83 Pfeiffer, E.:
Drüsenfieber
Jb. Kinderheilk. 29, 257 (1889)

84 PULVERTAFT, R.J.V.:
Cytology of Burkitt's tumour (African Lymphoma).
Lancet I, 238-240 (1964)

85 REEDMAN, B.M., and KLEIN, G.:
Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV) associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines.
Int. J. Cancer 11, 499-520 (1973)

86 RIEBER, E.P., V. HEYDEN, H.W., LINKE, R.P., SAAL, J.G., RIETHMÜLLER, G., and WALLER, H.D.:
Haarzelleukämie. Charakterisierung der leukämischen Zelle : Oberflächenimmunglobuline, Fc-Rezeptoren und Stimulation durch Mitogene.
Klin. Wschr. 54, 1011-1019 (1976)

87 RIEBER, E.P., SAAL, J.G., RIETHMÜLLER, G., V.HEYDEN, H.W., and WALLER, H.D.:
Strong expression of Fc-receptors on leukemic cells in hairy cell leukemia.
Z. Immun.-Forsch. 151, 282-288 (1976)

88 ROYSTON, J., SULLIVAN, J.L., PERLMAN, R.O., and PERLIN, E.:
Cell mediated immunity to Epstein-Barr virus transformed lympho-blastoid cells in acute infectious mononucleosis.
N. Engl. J. Med. 293, 1159-1163 (1975)

89 SAWYER, R., EVANS, A., NIEDERMAN, J., and MC COLLUM, R.:
Prospective studies of a group of Yale University freshmen. I. Occurence of infectious mononucleosis.
J. Infect. Dis. 123, 263-270 (1971)

90 SCHMITZ, H., and SCHERER, M.:
IgM antibodies to Epstein-Barr virus in infectious mononucleosis.
Arch. Ges. Virusforsch. 37, 332-339 (1972)

91 SHOPE, T., DECHAIRO, D., and MILLER, G.:
Malignant lymphoma in cotton-top marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2487-2491 (1973)

92 STEIN, H.:
Klassifikation der malignen non-Hodgkin Lymphome aufgrund gemeinsamer morphologischer und immunologischer Merkmale zwischen normaler und neoplastischer lymphatischer Zelle.
Immunität und Infektion 4, 95-106 (1976)

93 SVEDMYR, E., and JONDAL, M.:
Cytotoxic effector cells specific for B-cell lines transformed by Epstein-Barr virus are present in patients with infectious mononucleosis.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1622-1626 (1975)

94 TAYLOR, R.B., DUFFUS, W.P.H., RAFF, M.C., and DE PETRIS, S.:
Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody.
Nature N.B. (London) 233, 225 (1971)

95 VONKA, V., BENYESH-MELNIK, M., LEWIS, R.T., and WIMBERLY, I.:
Some properties of the soluble (s) antigen of cultured lymphoblastoid lines.
Arch. Ges. Virusforsch. 31, 113-124 (1970)

96 WINCHESTER, R.F., FU, S.M., HOFFMANN, T., and KUNKEL, H.G.:
IgG on lymphocyte surfaces; technical problems and the significance of a third cell population.
J. Immunol. 114, 1210-1212 (1975)

97 WOLF, H., ZUR HAUSEN, H., and BECKER, V.:
EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells.
Nature N.B. 244, 245-247 (1973)

98 WYBRAN, J., CARR, M.C., FUDENBERG, H.H.:
The human rosette-forming cell as marker of a population of thymus-derived cells.
J. clin. Invest. 51, 2537 (1972)

99 ZECH, L., HAGLUND, U., NILSSON, V., and KLEIN, G.: Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell lines from patients with Burkitt- and non-Burkitt-lymphomas.
Int. J. Cancer 17, 47-56 (1976)

L E B E N S L A U F

Am 23.11.1948 wurde ich, Herbert Stuckstedte, als Sohn des Schneidermeisters Alfred Stuckstedte und seiner Ehefrau Maria, geb. Gerhard, in Essen geboren. 1955 Eintritt in die Grundschule. 1960 Humboldtgymnasium Essen.
16.6.1970 Reifeprüfung am Eugen-Bolz-Gymnasium Rottenburg.
1972 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Stuttgart-Hohenheim.
1973 Universität Tübingen, Physikum 1974.
1975 erster Abschnitt, 1977 zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Praktisches Jahr an der Universitäts-Nervenklinik Tübingen und dem Städt. Krankenhaus Esslingen. Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung am 18.10.78 in Esslingen.
Assistenzarzt auf der Abteilung Neurologie I des Südwestdeutschen Rehabilitationskrankenhauses Karlsbad seit Nov.1978.

Druck: D. Gräbner, 8602 Altendorf - Tel. 09545/8791